

Uniwersytet Warszawski
Wydział Chemii



Marta Pokrzywnicka

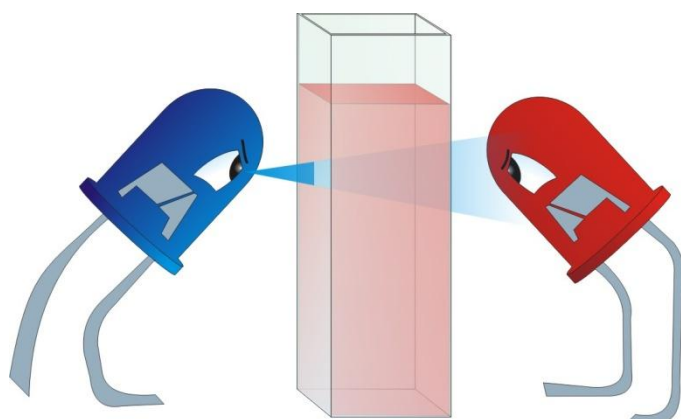
***Zastosowanie diod elektroluminescencyjnych
do konstrukcji detektorów i sensorów chemicznych***

Praca doktorska wykonana pod kierunkiem
prof. dr hab. Roberta Konckiego
w Pracowni Teoretycznych Podstaw Chemii Analitycznej

Warszawa 2012

„(...) zawsze jest łatwe rozwiązanie, jeśli tylko wie się, gdzie szukać.”

T. Pratchett *„Piąty Elefant”*



Pragnę złożyć serdeczne podziękowania:

Panu profesorowi Robertowi KONCKIEMU

Panu profesorowi Manuelowi MIRO

Panu doktorowi Łukaszowi TYMECKIEMU

Koleżankom i Kolegom z PTPChA, w szczególności:

mgr Kamilowi STRZELAKOWI, mgr Magdalenie REJNIS
i Marcie FIEDORUK

Mojej RODZINIE

Spis treści

1	Wstęp	4
---	-------------	---

Część literaturowa

2	Diody elektroluminescencyjne	5
2.1	Diody półprzewodnikowe	5
2.2	Elektroluminescencja	9
2.3	Budowa diody elektroluminescencyjnej	14
2.4	Właściwości LED	16
3	Detektory optyczne	18
3.1	Detektory fotoemisyjne	18
3.2	Detektory fotoprzewodzące	19
3.3	Detektory fotowoltaiczne	19
3.4	Dioda LED jako detektor fotowoltaiczny	21
4	Diody elektroluminescencyjne w chemii analitycznej	23
4.1	LED jako źródła promieniowania	23
4.1.1	Zastosowanie emiterów LED w fotometrii	23
4.1.2	Zastosowanie emiterów LED we fluorymetrii	27
4.1.3	Zastosowanie emiterów LED w konstrukcji optosensorów	28
4.2	LED jako detektory promieniowania	29
4.2.1	Zastosowanie detektorów LED w fotometrii	29
4.2.2	Zastosowanie detektorów LED we fluorymetrii	34
4.2.3	Zastosowanie detektorów LED do konstrukcji optosensorów	34
4.3	Najnowsze kierunki badań analitycznych sparowanych diod elektroluminescencyjnych	35

Badania własne

5	Cel i plan badań.....	36
6	Aparatura i odczynniki	38
7	Badania Wstępne diod elektroluminescencyjnych.....	42
	7.1 Diody elektroluminescencyjne jako źródła światła	42
	7.2 Diody elektroluminescencyjne jako detektory światła	47
	7.3 Podsumowanie	55
8	Fotometryczne pomiary kuwetowe.....	56
	8.1 Badania modelowe.....	56
	8.2 Oznaczanie kobaltu i żelaza(III).....	61
	8.3 Oznaczanie chininy	65
	8.4 Fotometr PEDD do celów edukacyjnych.....	69
	8.4.1 Oznaczanie wybranych barwników	71
	8.4.2 Wyznaczanie pKa barwników	73
	8.4.3 Pomiary bioanalityczne	75
	8.5 Podsumowanie	77
9	Fluorymetryczne pomiary kuwetowe	78
	9.1 Fluorymetryczne oznaczanie fluoresceiny.....	79
	9.2 Fluorymetryczne oznaczanie chininy.....	81
	9.3 Model działania fluory metru PEDD	84
	9.4 Podsumowanie	85
10	Fotometryczne pomiary przepływowe	86
	10.1 Oznaczanie błękitu bromotymolowego.....	86
	10.2 Oznaczanie kompleksów rodanowych kobaltu i żelaza(III)	90
	10.3 Oznaczanie białka całkowitego metodą Bradford	92
	10.4 Podsumowanie	97

11	Fluorymetryczne detektory przepływowe	98
11.1	Detekcja fluoresceiny	98
11.2	Oznaczanie wapnia w postaci kompleksu z kalceiną	101
11.3	Oznaczanie białka całkowitego	109
11.4	Podsumowanie	114
12	Sensory PEDD	115
12.1	Fotometryczne sensory PEDD	115
12.2	Sensor typu PEDD z warstwą chemoczułą z błękitu pruskiego	117
12.2.1	Oznaczanie reduktora (kwasu askorbinowego)	119
12.2.2	Oznaczanie utleniacza (nadtlenku wodoru)	123
12.2.3	Biosensory PEDD	126
12.3	Sensor fluorymetryczny	128
12.4	Podsumowanie	133
13	Podsumowanie	134
14	Literatura cytowana	140

1 Wstęp

Analityczne techniki optyczne, obejmujące zakres promieniowania widzialnego i ultrafioletu cieszą się dużą popularnością zarówno w analizie substancji organicznych jak i nieorganicznych, szczególnie dzięki prostej technice pomiarowej oraz selektywności, którą dodatkowo można poprawić przez sprzęganie ich z różnymi technikami rozdzielania. Dostępne komercyjne spektrofotometry i spektrofluorymetry dzięki nowoczesnym rozwiązaniom technologicznym mają coraz większą rozdzielczość i pozwalają osiągnąć coraz większą czułość oznaczeń. Jednak, np. w dedykowanych analizatorach czy systemach analizy przepływowej, te kompleksowe instrumenty można zastąpić prostszymi rozwiązaniami, dedykowanymi i tańszymi urządzeniami.

Diody elektroluminescencyjne, dzięki względnej monochromatyczności, stosunkowo dużej wydajności emisji, dużej trwałości mechanicznej i długiemu czasowi pracy idealnie sprawdzają się jako źródła promieniowania w prostych dedykowanych pomiarowych urządzeniach fotometrycznych i fluorymetrycznych. Od rozpoczęcia masowej produkcji w końcu lat sześćdziesiątych powstały setki publikacji dotyczących tego typu zastosowania LED.

Materiały półprzewodnikowe zastosowane w diodach elektroluminescencyjnych umożliwiają również stosowanie LED jako selektywnych detektorów promieniowania. Tego typu zastosowanie nie jest jednak zbyt szeroko omawiane w literaturze naukowej. Stąd też przedmiotem prowadzonych przeze mnie badań było opracowanie prostych optycznych urządzeń analitycznych w których LEDy pełnią obydwie funkcje: emitera oraz detektora.

2 Diody elektroluminescencyjne

Diody elektroluminescencyjne (LED ang.- *Light Emitting Diodes*) są obecnie jednymi z najpopularniejszych źródeł światła. Są obecne w niemal wszystkich nowoczesnych urządzeniach elektronicznych, gdzie pełnią funkcję podświetlaczy, znaczników kontrolnych lub wyświetlaczy. Wykonuje się z nich również wielkoformatowe wyświetlacze a ostatnimi czasy dużą popularnością cieszą się również telewizory LCD wykorzystujące przeciwświetlenie LED. Ponadto LED są coraz częściej spotykane w motoryzacji, zarówno w roli oświetlenia konsoli rozdzielczej aut jak i w układach świateł postojowych, świateł „STOP”, kierunkowskazów, oświetlenia wnętrza samochodu. Stosuje się je także w sygnalizatorach świetlnych lub jako podświetlenia znaków drogowych.

Dzięki małym rozmiarom, trwałości i prostocie w eksploatacji znajdują również inne zastosowania praktyczne m.in.: w pilotach zdalnego sterowania, w optycznych portach komunikacyjnych [1], w czujnikach dymu oraz w czujnikach ruchu komputerowych myszy optycznych. Stosuje się je również do sterylizacji wody promieniowaniem UV [2], w fotopletyzmografach [3], można również znaleźć wzmianki o fototerapii z wykorzystaniem LED [4]. Na szczególną uwagę zasługują również tzw. OLEDy (*Organic Light Emitting Diodes*) – diody, których aktywne elementy wykonane są z polimerów przewodzących i które znalazły zastosowanie m.in. w produkcji wyświetlaczy telefonów komórkowych czy odtwarzaczy mp3.

Obecnie, wprowadzany w krajach Unii Europejskiej zakaz produkcji tradycyjnych żarówek [5] powoduje dodatkowo wzrost popularności diod elektroluminescencyjnych. Szacuje się że udział LED w globalnym rynku oświetlenia w 2020 roku może osiągnąć nawet 70% [6].

2.1 Diody półprzewodnikowe

Dioda LED jest jednym z rodzajów diod półprzewodnikowych i tak jak w przypadku każdej diody tego typu, jej najistotniejszy element stanowi złącze półprzewodników typu n i p . Warstwa półprzewodnika typu n zawiera atomy domieszek o charakterze donorowym, które powodują występowanie w tej warstwie nadmiaru elektronów. Warstwa półprzewodnika typu p zawiera atomy domieszek o charakterze akceptorowym, które powodują występowanie w strukturze krystalicznej ubytków elektronowych tzw. dziur.

Elektrony w półprzewodnikach n i dziury w półprzewodnikach p , stanowią tzw. nośniki większościowe i odpowiedzialne są za przewodzenie ładunku przez półprzewodnik.

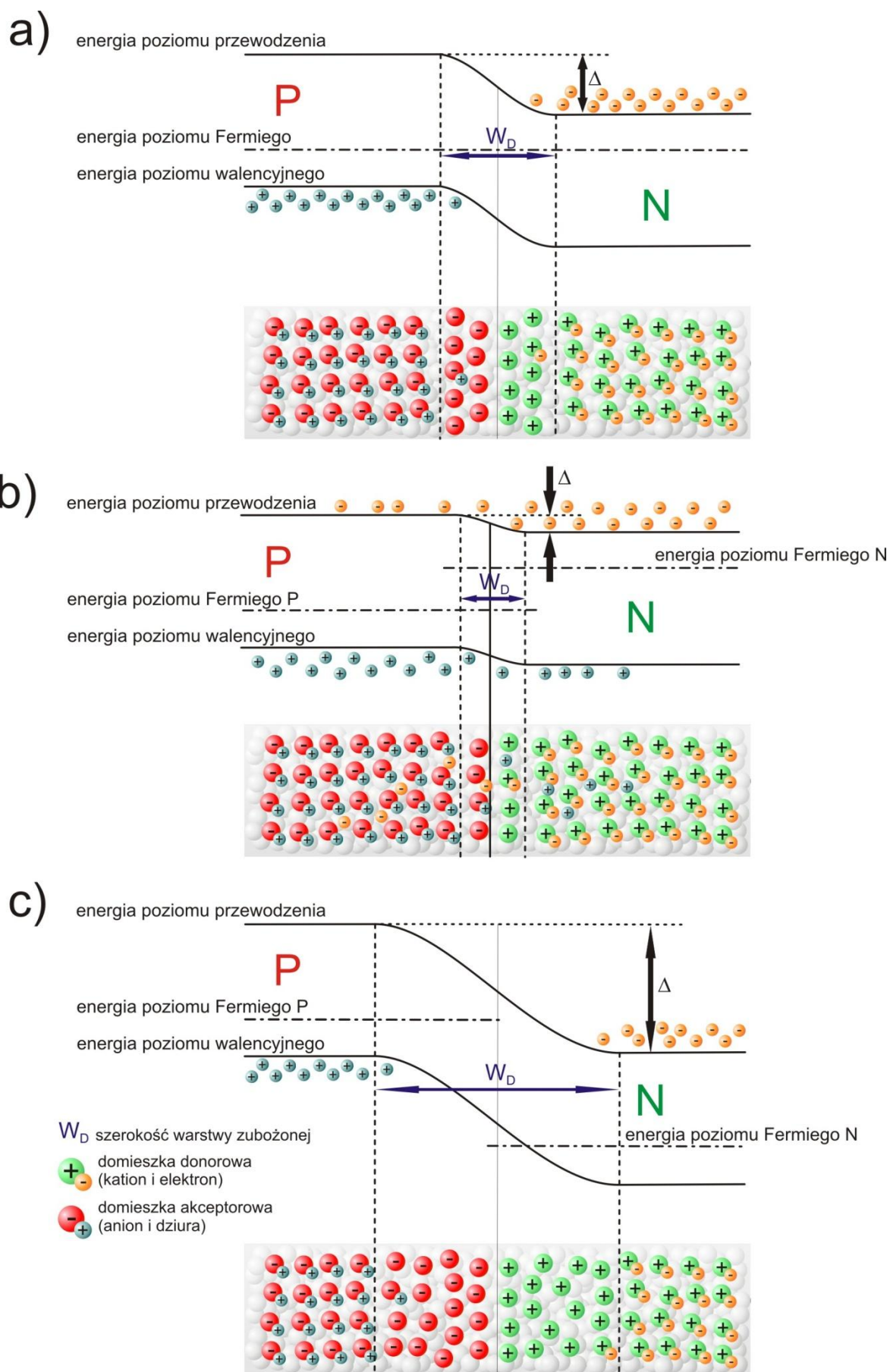
W warunkach równowagi termodynamicznej (rys. 2.1.a), elektrony z półprzewodnika typu n dyfundują do warstwy półprzewodnika p i rekombinują z dziurami. Proces ten zachodzi również w przeciwnym kierunku, dziury z półprzewodnika typu p dyfundują do półprzewodnika n rekombinując z elektronami [7]. W efekcie tego ciągłego procesu rekombinacji ustala się stan równowagi a w pobliżu kontaktu obu warstw powstaje strefa pozbawiona nośników - tzw. warstwa zubożona. Jedyne ładunki w tym miejscu pochodzą od zjonizowanych donorów i akceptorów. Powoduje to powstanie tzw. potencjału dyfuzyjnego E_D [8], W tym przypadku potencjał dyfuzyjny definiuje wysokość bariery energetycznej, którą muszą pokonać nośniki aby dotrzeć do warstwy neutralnej drugiego półprzewodnika, oznaczonej na rysunku 2.1 symbolem Δ ($\Delta = \bar{e} (E_D)$).

Jeżeli złącze zostanie spolaryzowane w kierunku przewodzenia (ładunek dodatni przyłożony do półprzewodnika p i ujemny do n) do obszaru złącza cały czas będą dostarczane nowe nośniki i warstwa zubożona zostanie zmniejszona (rysunek 2.1.b). Dodatkowo również wysokość bariery energetycznej zmniejszy się odpowiednio do przyłożonego napięcia [8]:

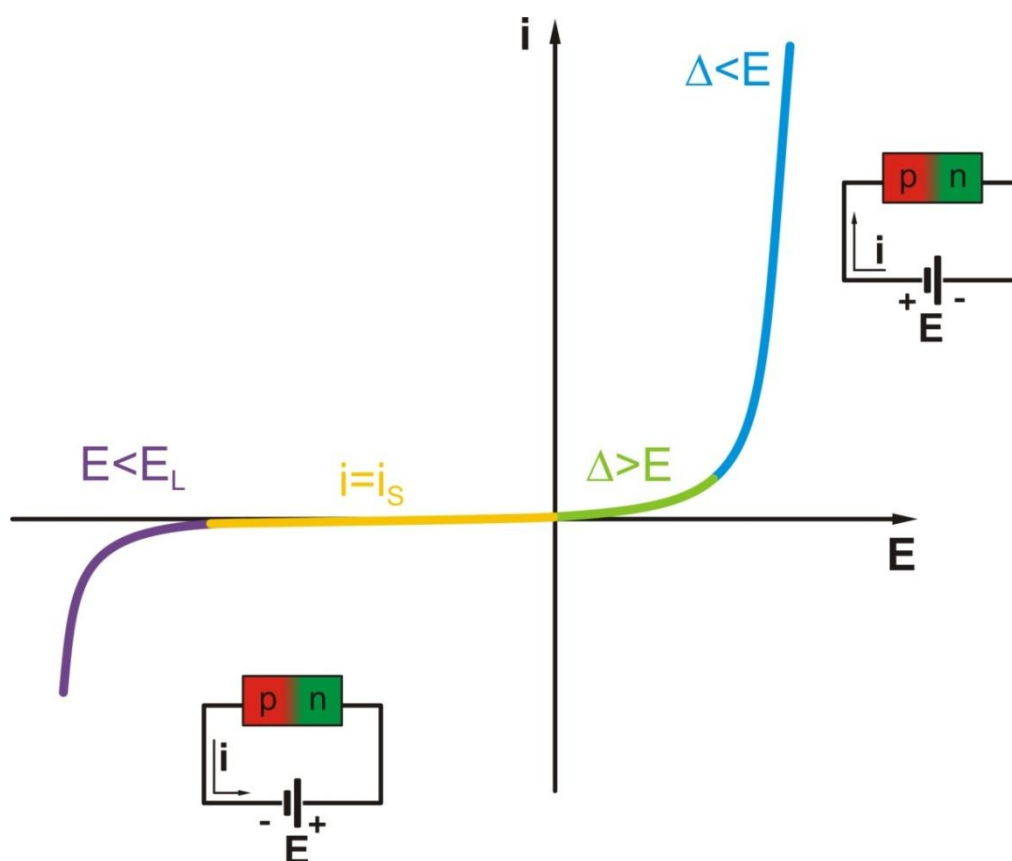
$$\Delta = \bar{e} (E_D - E)$$

W związku z tym, wraz ze wzrostem przykładanego napięcia, coraz więcej nośników będzie mogło pokonać barierę, co spowoduje gwałtowny wzrost przewodzenia i płynącego przez złącze prądu.

Jeżeli złącze spolaryzowane w przeciwnym kierunku - zaporowo (rys. 2.1.c), nośniki większościowe migrują od złącza w kierunku kontaktów. Zwiększa się szerokość warstwy zubożonej a wysokość bariery energetycznej zwiększa się adekwatnie do przyłożonego napięcia. Przez diodę, za pośrednictwem nośników mniejszościowych, płynie wtedy jedynie niewielki prąd wsteczny, o natężeniu rzędu piko- lub nanoamperów [9]. Ze wzrostem napięcia zaporowego dioda dosyć szybko ulega wysyceniu. Płynący przez wysyconą diodę wsteczny prąd tzw. prąd wysycenia, jest zależny praktycznie wyłącznie od parametrów materiałów półprzewodnikowych diody i konstrukcji złącza (współczynnik dyfuzji, czas życia i ilość nośników) i niezależny od przyłożonego napięcia. Jeżeli jednak przyłożone napięcie osiągnie pewną progową (E_L) wartość może nastąpić miejscowa jonizacja atomów w sieci krystalicznej. Takie lawinowe powielanie nośników w warstwie zubożonej może z kolei doprowadzić do przebicia złącza i gwałtownego wzrostu natężenia prądu [10].



Rysunek 2.1 Złącze p-n: a) niespolaryzowane; b) spolaryzowane w kierunku przewodzenia; c) spolaryzowane zaporowo.



Rysunek 2.2 Charakterystyka prądowo napięciowa idealnej diody.

Wszystkie przedstawione wyżej procesy są opisane matematycznie przez charakterystykę prądowo - napięciową diody, a obrazem tych zależności jest wykres przedstawiający natężenie prądu płynącego przez diodę, w funkcji przyłożonego do niej napięcia (rys. 2.2.). Zależności wynikające z charakterystyki prądowo-napięciowej dla doskonałej diody precyzyjnie opisuje równanie Shockley'a [8].

$$i = \bar{e}A \left(\sqrt{\frac{D_p}{\tau_p}} \frac{n_i^2}{N_D} + \sqrt{\frac{D_n}{\tau_n}} \frac{n_i^2}{N_A} \right) (e^{\frac{\bar{e}E}{kT}} - 1)$$

gdzie:

i - natężenie prądu płynącego przez diodę, \bar{e} - ładunek elektronu, A - powierzchnia złącza, D_p i D_n - stałe dyfuzyjne nośników, τ_p i τ_n - czasy życia nośników, N_D i N_A - stężenia domieszek donorowej i akceptorowej, n_i - stężenie nośników samoistnych, E - potencjał przykładany do diody, T - temperatura wyrażona w Kelwinach, k - stała Boltzmanna

ponieważ wyrażenie: $\bar{e}A \left(\sqrt{\frac{D_p}{\tau_p}} \frac{n_i^2}{N_D} + \sqrt{\frac{D_n}{\tau_n}} \frac{n_i^2}{N_A} \right)$ opisuje opisany wcześniej prąd nasycenia i_s

natomiast $\frac{kT}{\bar{e}}$ to tzw. potencjał elektrochemiczny E_T , równanie można przedstawić jako:

$$i = i_s(e^{\frac{E}{E_T}} - 1)$$

Równanie to jest bardzo często spotykane również w postaci:

$$i = i_s(e^{\frac{E}{nE_T}} - 1)$$

gdzie n jest dodatkowym współczynnikiem korelacji.

2.2 Elektroluminescencja

Przyczyną emisji promieniowania przez diodę jest zjawisko elektroluminescencji [8]. W przeciwieństwie do zjawiska inkandescencji, w którym emisja światła wynika z wysokiej temperatury ośrodka, w procesie elektroluminescencji kluczową rolę odgrywa przepływ ładunków.

Istotą każdego rodzaju luminescencji jest przejście elektronu z wysokoenergetycznego stanu wzbudzonego do stanu podstawowego, z wyemitowaniem nadmiaru energii w postaci kwantu promieniowania. W przypadku elektroluminescencji przejście takie następuje z pasma przewodnictwa półprzewodnika typu n do pasma walencyjnego półprzewodnika typu p . Jak nadmieniałam w poprzednim rozdziale w obszarze złącza tzw. obszarze aktywnym, elektrony obecne w półprzewodniku typu n rekombinują z dziurami półprzewodnika p . Jeżeli na skutek tego procesu generowany jest foton, mówimy o rekombinacji promienistej.

Elektrony mogą zajmować wolne miejsca na powłokach walencyjnych atomów domieszek akceptorowych. Jednak aby proces ten mógł mieć miejsce muszą być spełnione dwa podstawowe warunki: należy zachować energię i pęd układu [11]. Emitowany w wyniku przejścia foton pozwala na zachowanie energii układu, nie rozwiązuje jednak problemu pędu. Dlatego też aby przejście mogło mieć miejsce elektron może rekombinować wyłącznie z dziurą o identycznym lub przeciwnym pędzie. W związku z tym wydajność procesu emisji określana jest pewną wartością prawdopodobieństwa trafienia przez elektron, bądź dziurę na odpowiedni do rekombinacji przeciwnośnik. Jednak rekombinacja promienista nie jest jedynym zjawiskiem zachodzącym w obszarze złącza diody elektroluminescencyjnej. Wyemitowany foton może zostać zabsorbowany powodując powstanie pary elektron-dziura (proces generacji) a każdy z tych nośników może z określonym prawdopodobieństwem ponownie rekombinować. Dodatkowo na skutek defektów sieci krystalicznej może dochodzić

do tzw. rekombinacji niepromienistej. Elektron wytraca wówczas energię na skutek oscylacji sieci, bądź w formie fononów. Proces ten jest oczywiście nie pożądany ponieważ konkuruje z rekombinacją promienistą.

Odwrotność czasów w jakich dochodzi do poszczególnych rodzajów rekombinacji (τ_r i τ_{nr}), będzie determinować prawdopodobieństwo ich zajścia i może stanowić jedną z metod wyznaczania wewnętrznej wydajności kwantowej emisji LED η_{int} [8].

$$\eta_{int} = \frac{\frac{1}{\tau_r}}{\frac{1}{\tau_r} + \frac{1}{\tau_{nr}}}$$

Wewnętrzną wydajność kwantową emisji można też określić jako ilości wyemitowanych na jednostkę czasu fotonów (N_f) w stosunku do ilości dostarczanych do złącza elektronów ($N_{\bar{e}}$).

$$\eta_{int} = \frac{N_f}{N_{\bar{e}}}$$

Ponieważ

$$N_f = \frac{P}{h\nu}$$

natomiast

$$N_{\bar{e}} = \frac{i}{\bar{e}}$$

gdzie:

P - moc wyemitowanego promieniowania, h - stała Plancka, ν - częstotliwość generowanego promieniowania, i - natężenie prądu płynącego przez diodę, \bar{e} - ładunek elektronu
można otrzymać następującą zależność:

$$\eta_{int} = \frac{N_f}{N_{\bar{e}}} = \frac{\frac{P}{h\nu}}{\frac{i}{\bar{e}}} = \frac{P\bar{e}}{h\nu i}$$

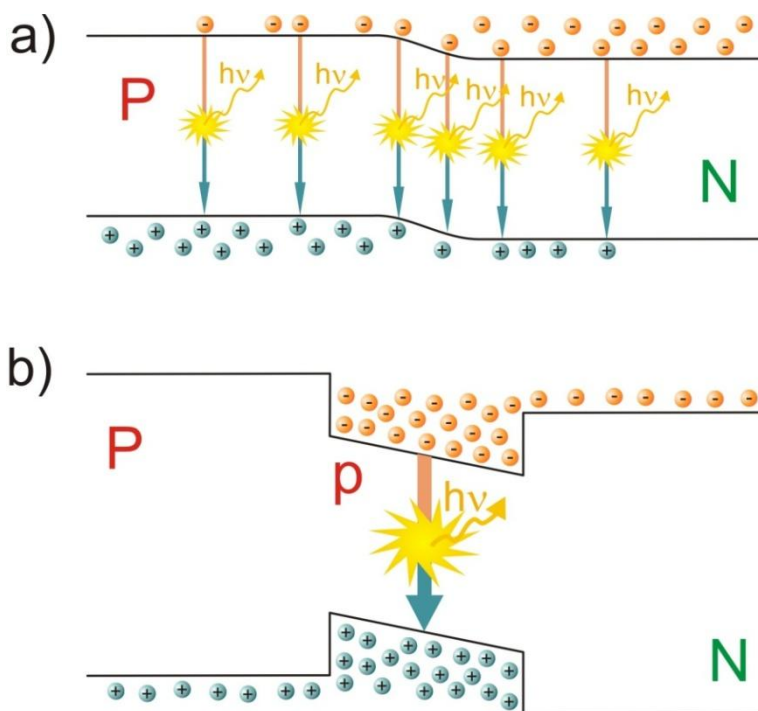
Przekształcając to równanie do postaci:

$$P = \frac{\eta_{int} h\nu}{\bar{e}} i$$

można zauważyć, że moc emitowanego przez diodę promieniowania jest wprost proporcjonalna do płynącego przez nią prądu. Ta zależność będzie prawdziwa również dla natężenia promieniowania I , które jest równe mocy promieniowania P , wysłanego w jednostkowy kąt bryłowy Ω .

$$I = \frac{\eta_{int} h\nu}{\bar{e}\Omega} i$$

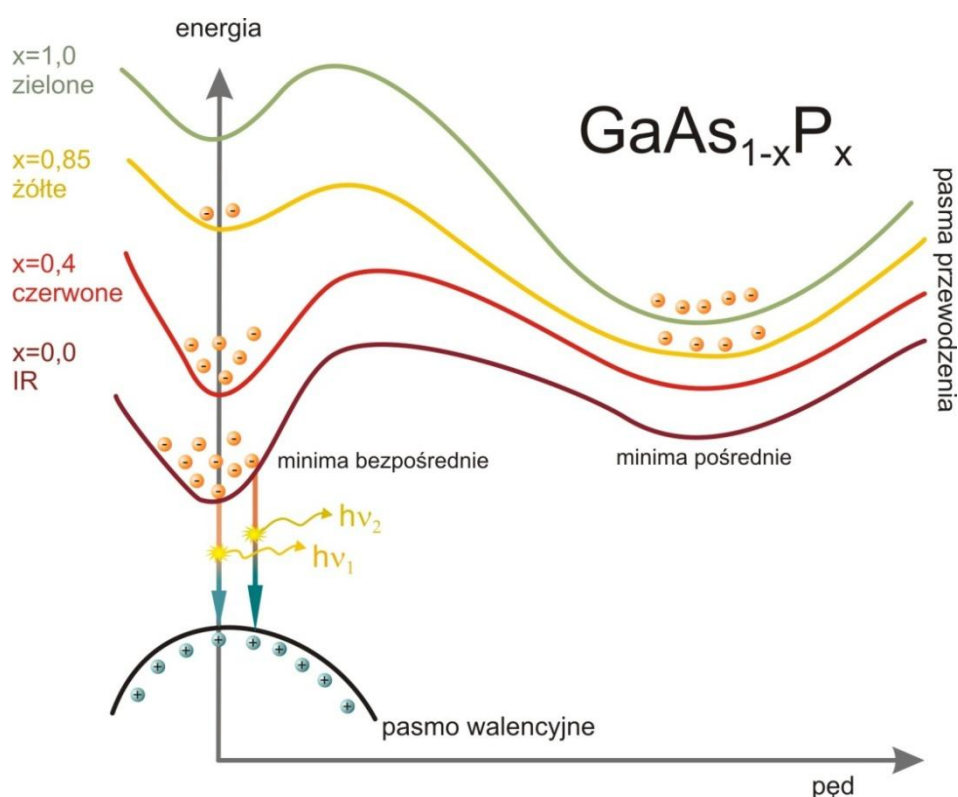
Czasy życia nośników, a tym samym prawdopodobieństwa rekombinacji i wydajność kwantowa emisji, zależą od ich ilości. Jak łatwo się domyśleć im większa koncentracja elektronów i dziur w obszarze złącza, tym większe prawdopodobieństwo wystąpienia pary przeciwnośników o odpowiednich pędach. Jednak jak widać na rysunkach 2.1.b i 2.3.a, na spolaryzowanym w kierunku przewodzenia złączu elektrony i dziury mogą dyfundować poza obszar złącza (odległość równą iloczynowi czasu ich życia i współczynnika dyfuzji). W zależności od parametrów diody ich droga dyfuzji może wynosić od 1 do nawet $20\mu\text{m}$. Powoduje to znaczące poszerzenie obszaru aktywnego i zmniejszenie stężenia nośników a tym samym prawdopodobieństwa rekombinacji. Aby ograniczyć to zjawisko we współczesnych diodach stosuje się tzw. podwójne heterozłącze (rys. 2.3.b). Obszar aktywny o małej energii pasma wzbronionego (najczęściej wykonany z półprzewodnika typu p o niewielkiej zawartości domieszek), ograniczony jest obszarem barierowym o wysokiej przerwie energetycznej (półprzewodniki o większych stężeniach domieszek). Rozwiązanie to pozwala kumulować nośniki w wąskim obszarze aktywnym (nie większym niż $1\mu\text{m}$) zwiększając prawdopodobieństwo rekombinacji promienistej i wydajność emisji LED. Rozwiązanie to ma pewne ograniczenie, mianowicie przy dużym natężeniu prądu zasilania diody rośnie stężenie nośników w warstwie aktywnej i wzrasta energia poziomu Fermiego.



Rysunek 2.3 Rozmieszczenie nośników w obszarze spolaryzowanego homo - i hetero złącza.

Jeżeli wysokość poziomu energetycznego Fermiego równa się z wysokością poziomu bariery, następuje *przelew nośników (carrier overflow)* poza obszar aktywny. W tej sytuacji dodatkowe zwiększenie natężenia prądu zasilania nie będzie miało dużego wpływu na wzrost intensywności emisji.

Oprócz poprawionej wydajności emisji współczesna technika umożliwia otrzymanie LED o praktycznie dowolnej barwie świecenia. Wartość energii, a tym samym długość fali powstałego w procesie rekombinacji fotonu, jest równa różnicy energii między poziomem przewodzenia półprzewodnika n i poziomem walencyjnym półprzewodnika p i jest to wielkość charakterystyczna dla poszczególnych materiałów. Tak więc, odpowiednio dobierając skład pierwiastkowy półprzewodnika, można otrzymać materiał o różnicy energii pomiędzy poziomami odpowiadającymi zakresom fal świetlnych od ultrafioletu poprzez obszar widzialny aż po podczerwień. Należy jednak pamiętać, że tak jak w każdym układzie rzeczywistym poszczególne elektrony mogą się nieznacznie różnić między sobą energią (rysunek 2.4) w związku z czym generowane będą również fotony o energii większej/mniejszej niż wynikałoby to z wysokości przerwy energetycznej.



Rysunek 2.4 Wysokość przerwy energetycznej dla różnych wariantów domieszkowania półprzewodnika na przykładzie GaAsP [11].

Aby zmienić kolor emitowanego światła, należy zmienić wysokość przerwy energetycznej w materiale półprzewodnikowym. Dysponując arsenkiem galu, którego przerwa energetyczna wynosi 1,42eV, można otrzymać diodę podczerwoną o maksimum emisji przy 870nm [8]. Aby otrzymać diodę emitującą promieniowanie widzialne należy zwiększyć wysokość przerwy energetycznej. Można tego dokonać mieszając GaAs z innym materiałem o większej szerokości obszaru wzbronionego np. GaP, którego przerwa energetyczna to 2,3eV co odpowiada ok. 555nm czyli promieniowaniu zielonemu. Dobierając odpowiednią proporcję arsenu do fosforu można otrzymać praktycznie dowolny emiter z zakresu od 870 do 555nm (rys. 2.4).

Rozwiązanie to ma jednak pewne ograniczenie. Jak widać na rysunku 2.4 krzywa energii ma dwa minima. Minimum bezpośrednie, w którym pęd elektronów ma wartości zbliżone do pędu dziur w paśmie walencyjnym i może zachodzić proces rekombinacji promienistej oraz minimum pośrednie, z którego przejścia są wzbronione. Najkorzystniejsza sytuacja dla procesu rekombinacji ma miejsce kiedy minima bezpośrednie charakteryzują się niższą energią i to w nich koncentrują się elektrony (półprzewodniki bezpośrednie). Jednak w miarę zmiany składu półprzewodnika, krzywe zmieniają swój kształt i w określonych warunkach minima pośrednie mają niższą energię i zostają obsadzone przez nośniki (półprzewodniki pośrednie). W związku z tym drastycznie spada wydajność kwantowa emisji promieniowania. W przypadku fosforku galu problem ten rozwiązuje się przez dodatek tzw. optycznie czynnych zanieczyszczeń izoelektronowych. Jednak jest to wyjątek gdyż wydajność kwantowa emisji takiej diody pozostaje niewielka.

Oprócz wspomnianych wcześniej domieszkowań galu arsenem i fosforem, w chipach współczesnych diod elektroluminescencyjnych występują również domieszki glinu, indu i azotu. Przykłady materiałów stosowanych obecnie do produkcji LED przedstawiam w tabeli 2.1. Największą popularnością cieszą się AlGaInP, który w zależności od proporcji glinu do galu służy do konstrukcji diod emitujących promieniowanie od czerwonego (ok. 650nm) do żółto-zielonego (ok. 580nm) [8]. Do emisji promieniowania z zakresu UV do zieleni (525nm) stosuje się InGaN. Teoretycznie, dobierając odpowiedni stosunek indu do galu można otrzymać praktycznie dowolny emiter z zakresu od ultrafioletu do bliskiej podczerwieni (GaN emituje UV, InN- IR). W praktyce jednak, zbyt duża zawartość indu w materiale powoduje powstawanie licznych defektów w sieci krystalicznej, co pogarsza wydajność emisji i ogranicza stosowane tego typu materiałów.

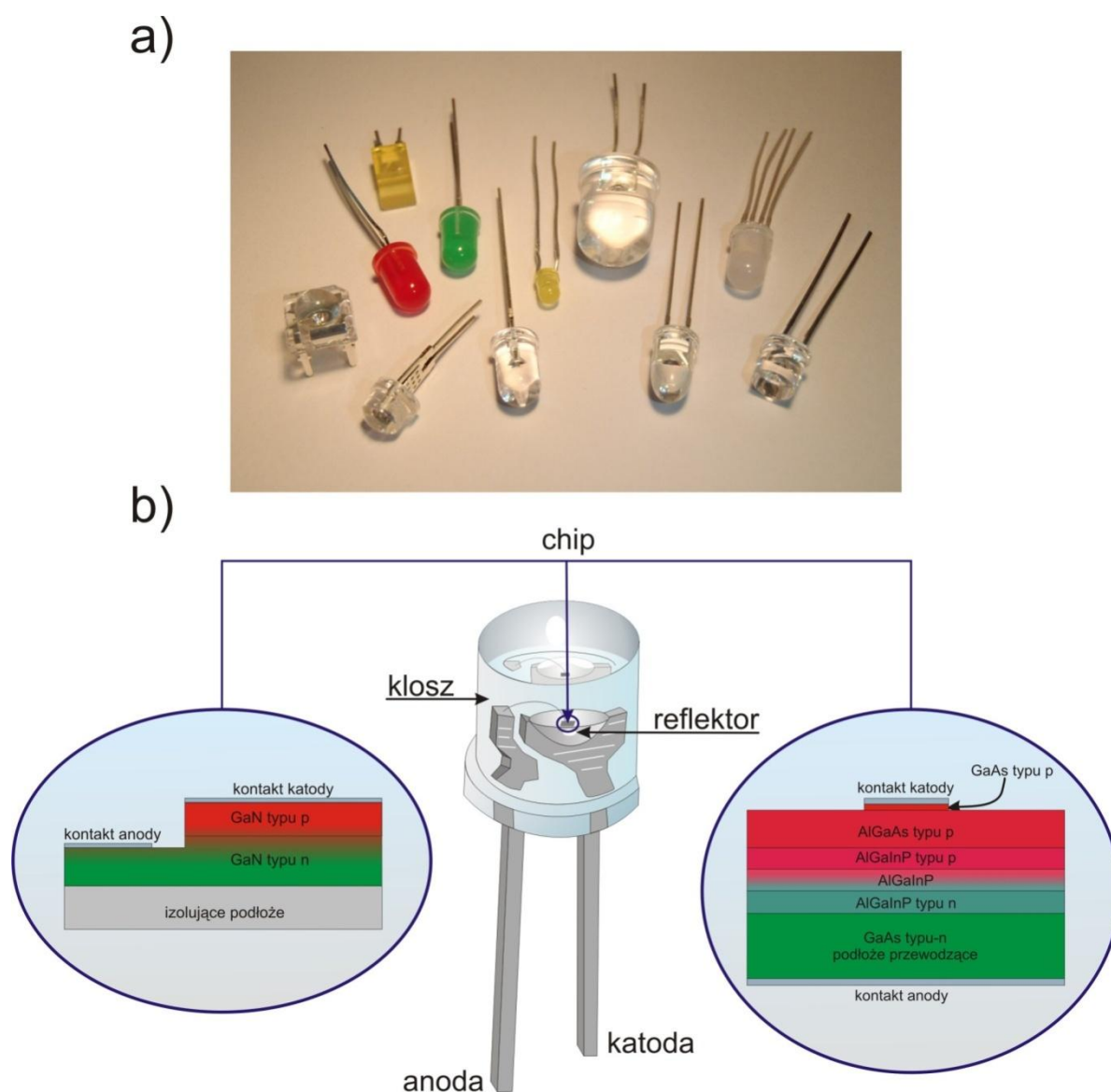
Tabela 2.1 Materiały półprzewodnikowe stosowane we współczesnych diodach elektroluminescencyjnych.

Materiał diody	Substancje składowe (λ_{\max})	Ograniczenie zakresu emisji
GaAsP	GaAs (870nm)	GaP jest półprzewodnikiem pośrednim. Aby zwiększyć jego wydajność emisji dodaje się optycznie czynne zanieczyszczenia izoelektronowe np: azot (GaP:N)
	GaP (555nm)	
AlGaAs	GaAs (900nm)	$\text{Al}_{0,45}\text{Ga}_{0,55}\text{As}$ (624nm)- materiały z wyższą zawartością glinu są półprzewodnikami pośrednimi
	AlAs (428nm)	
AlGaInP	$\text{Ga}_{0,5}\text{In}_{0,5}\text{P}$ (655nm)	$\text{Al}_{0,27}\text{Ga}_{0,23}\text{In}_{0,5}\text{P}$ (555nm) materiały z wyższą zawartością glinu są półprzewodnikami pośrednimi
	$\text{Al}_{0,5}\text{In}_{0,5}\text{P}$ (495nm)	
InGaN	GaN (355nm)	Ze względu na wzrost dyslokacji sieci krystalicznej z rosnącą zawartością In, materiał stosuje się do produkcji emiterów z zakres 355- 525nm
	InN (1400nm)	

2.3 Budowa diody elektroluminescencyjnej

Z pozoru dioda elektroluminescencyjna jest urządzeniem o dość prostej budowie (rys.2.5), w najprostszym wariantcie jest to kloz, wyprowadzenia elektrod oraz półprzewodnikowy chip. Każdy z elementów spełnia różne funkcje a ich budowa, jest zoptymalizowana tak, aby zapewnić maksymalną trwałość i wydajność emisji.

Najistotniejszy element diody elektroluminescencyjnej stanowią elektrody. W katodzie znajduje się lejkowate wgłębienie, w którym przyklejony bądź przylutowany jest chip. Pełni ono funkcję reflektora, który odbija promieniowanie emitowane przez boki chipa i pozwala skupić wiązkę wyemitowanego światła w na niewielkim obszarze przed czołem diody.



Rysunek 2.5 a: Przykładowe rozwiązanie konstrukcyjne budowy LED małej mocy; b: Budowa diody elektroluminescencyjnej oraz przykładowe konstrukcje chipa.

Wymienione komponenty otoczone są kloszem, który najczęściej jest wykonany z żywic epoksydowych. Można spotkać również klosze silikonowe i metakrylanowe. Generalnie materiał klosza musi spełniać wiele kryteriów takich jak: transparentność, stabilność chemiczna i termiczna, hermetyczność czy wysoka wartość współczynnika załamania światła. Ten ostatni parametr ma największe znaczenie. Ponieważ materiały półprzewodnikowe charakteryzują się znacznie większym od powietrza współczynnikiem załamania światła ($n > 2$), w przypadku braku klosza, tylko niewielka część promieniowania, generowanego w obszarze złącza, mogłaby opuścić obszar chipa ze względu na niewielką wartość krytycznego kąta odbicia wewnętrznego, na granicy tych ośrodków. Otoczenie chipa

materiałem o wysokim współczynniku załamania światła zwiększa wartość kąta krytycznego i poprawia wydajność emisji.

Najważniejszym i zarazem najbardziej złożonym elementem diody elektroluminescencyjnej jest chip. Początkowo jego budowa ograniczała się do 2-3 warstw półprzewodników (p , n oraz warstwa bazowa). Należy przy tym zaznaczyć, że do produkcji LED używa się wyłącznie półprzewodników typu III-V. Obecnie konstrukcja taka posiada wiele modyfikacji mających na celu poprawienie wydajności emisji. Jednym ze stosowanych wariantów konstrukcyjnych jest wspomniane wcześniej podwójne heterozłącze. Stosuje się również dodatkowe warstwy półprzewodnikowe mające zoptymalizować gęstość prądu w obszarze złącza warstwy lub odbijające promieniowanie w kierunku górnej powierzchni chipu (reflektory Bragga) [8]. Ponadto, jak widać na rysunku 2.5 mogą występować różnice w rozmieszczeniu kontaktów w zależności od zastosowanych materiałów.

2.4 Właściwości LED

Diody elektroluminescencyjne emitują względnie monochromatyczne promieniowanie, z zakresu od podczerwieni do bliskiego nadfioletu, bez konieczności stosowania filtrów optycznych. Trzeba jednak wziąć pod uwagę, że różnobarwne diody, ze względu na różne wysokości bariery energetycznej złącza, wymagają różnych wartości napięcia zasilającego. Do zasilania czerwonych LED wystarczy napięcie 1,5V natomiast niebieskie i UV potrzebują napięcia powyżej 3V. Niektóre materiały, jak węgiel krzemu mogą emitować światło o różnych barwach, w zależności od przyłożonego napięcia, jednak ze względu na dość słabą emisję rozwiązanie to nie jest powszechnie stosowane [8].

W zależności od wykorzystanych w nich rozwiązań technologicznych, diody elektroluminescencyjne mogą uzyskiwać różne wartości natężenia strumienia świetlnego. Wartości te mogą się zmieniać w szerokim zakresie, ze względu na liczne czynniki wpływające na wydajność rekombinacji, stąd też istotnym parametrem diody jest przybliżona wartość luminancji przy danym prądzie zasilania - najczęściej 20mA. Parametr ten zwykle podawany jest w kandelach - jednostce określającej natężenie światła emitowanego w jednostkowym kącie bryłowym. W zależności od zastosowanych rozwiązań konstrukcyjnych, wyemitowana wiązka, po opuszczeniu klosza może w różnym stopniu rozchodzić się w przestrzeni. Stąd też jednym z parametrów LED jest wartość kąta

bryłowego, ograniczającego emitowaną wiązkę. Wartość tego kąta może wynosić od 5° do 140° , chociaż najczęściej spotykane wartości to 30° - 40° .

Istotną zaletą LED jest fakt, że w chwili zamknięcia obwodu elektrycznego praktycznie od razu osiągają maksymalną wartość emisji. Zwykła żarówka, aby osiągnąć 90% swojej światłości, potrzebuje $2 \cdot 10^{-2}$ s, natomiast w przypadku LED jest to czas rzędu dziesiątych mikrosekund. Pozwala to m.in. na generowanie krótkich impulsów świetlnych.

Wydajność, niewielki prąd zasilania a także prosta konstrukcja układów zasilających, duża trwałość, względnie wysoka odporność mechaniczna i niezawodność to cechy, które dodatkowo przyczyniają się do rosnącej popularności diod elektroluminescencyjnych. Dodatkowo należy podkreślić że technologia LED nadal dynamicznie się rozwija, a kolejne generacje diod są stabilniejsze, bardziej wydajne i tańsze.

3 Detektory optyczne

Najistotniejszym elementem optycznych urządzeń analitycznych są detektory promieniowania. Generalnie detektory optyczne można podzielić na dwie grupy [12]: detektory fotonowe i termiczne, przy czym te drugie ze względu na mniej korzystny stosunek sygnału do szumu, mniejszą czułość i dłuższy czas odpowiedzi, są raczej rzadko spotykane. Detektory fotonowe, których podstawą działania jest oddziaływanie fotonów z elektronami czyli tzw. efekt fotoelektryczny, można podzielić na trzy grupy: detektory fotoemisyjne, fotoprzewodzące oraz fotowoltaiczne.

3.1 Detektory fotoemisyjne

Podstawą działania detektorów fotoemisyjnych jest tzw. efekt fotoelektryczny zewnętrzny. Zjawisko to polega na wybiciu elektronu z materiału w wolną przestrzeń, na skutek oddziaływania z padającym na powierzchnię detektora fotonem. Aby do tego doszło energia fotonu musi być większa niż praca wyjścia/energia jonizacji, można więc mówić o pewnej selektywności tego typu detektorów.

Najprostszym detektorem fotoemisyjnym jest fotokomórka. Najważniejszym elementem budowy tego urządzenia jest fotokatoda pokryta materiałem o dużym współczynniku absorpcji i małym powinowactwie elektrycznym (małej pracy wyjścia). Foton absorbowany jest przez materiał fotokatody a emitowany elektron przyspieszany jest w polu elektrycznym, powstałym na skutek polaryzacji elektrod fotokomórki, i zbierany jest przez anodę, generując fotoprąd proporcjonalny do intensywności padającego na detektor promieniowania. Czułość urządzenia można poprawić wprowadzając dodatkowe elektrody - dynody, na których będzie zachodziła wtórna emisja elektronów. Najnowszym rozwiązaniem są MCP (*Micro Channel Plate*) płytki z mikrokanalikami powielającymi. Jest to matryca gęsto upakowanych kapilar pokrytych wewnątrz materiałem półprzewodnikowym i pełniących rolę fotopowielaczy. Kapilary umieszczone są między dwoma metalowymi płytkami, które zabezpieczają końce rurek i pełnią funkcję elektrod. Urządzenie to pozwala na wzmocnienie sygnału nawet o siedem rzędów wielkości [12].

Detektory fotoemisyjne, zwłaszcza fotopowielacze, ze względu na bardzo dobrą czułość, są często spotykanymi detektorami w analitycznych urządzeniach pomiarowych.

3.2 Detektory fotoprzewodzące

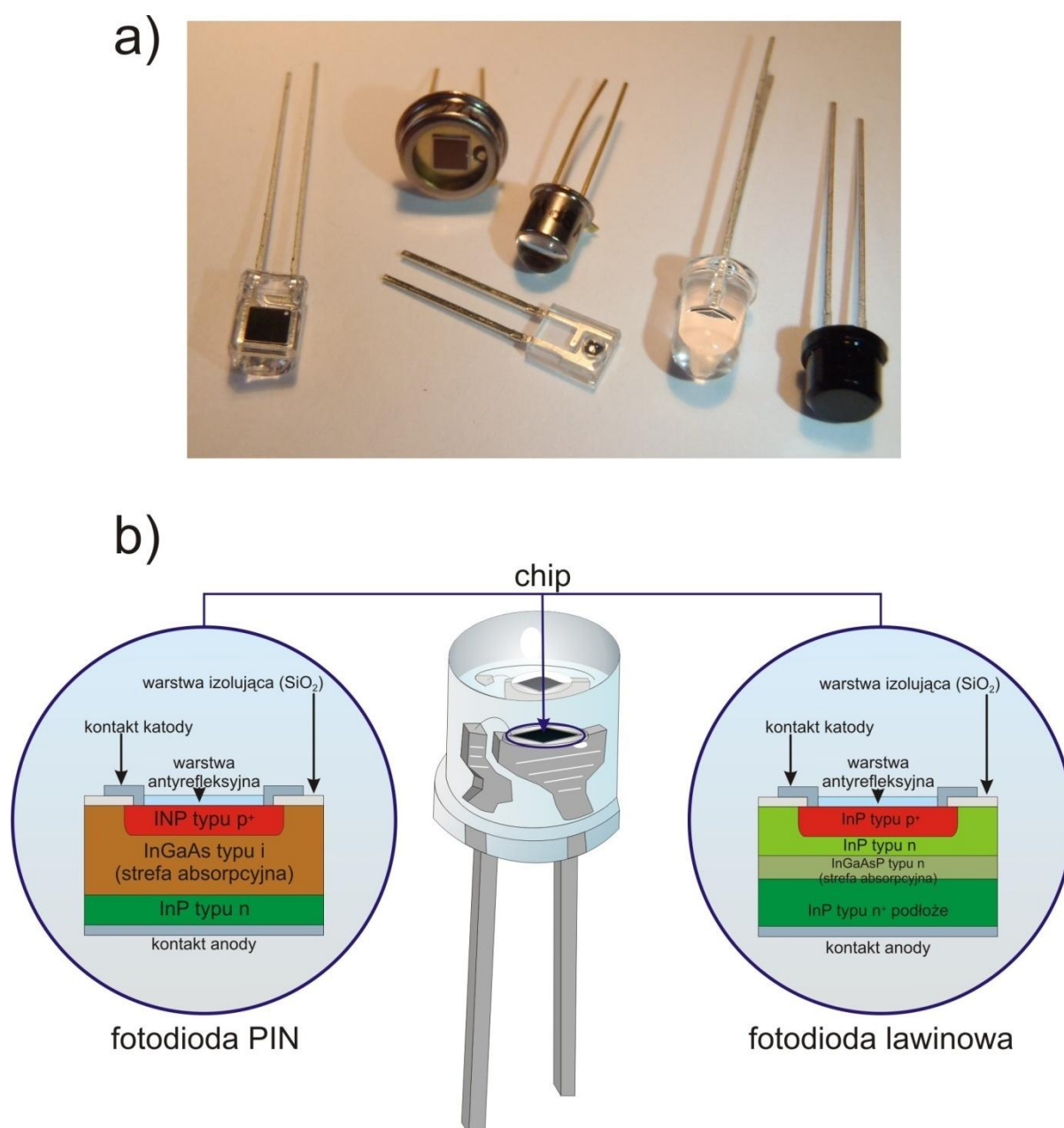
Tak samo jak w przypadku detektorów fotoemisyjnych, podstawą działania detektorów fotoprzewodzących - fotorezystorów (*Light Depended Resistors*) jest oddziaływanie fotonów z elektronami. Jednak w tym przypadku, elektron zamiast być emitowany w przestrzeń zostaje przeniesiony na wyższy poziom energetyczny pozostawiając *dziurę* w paśmie walencyjnym. Jest to tzw. efekt fotoelektryczny wewnętrzny, zjawisko odwrotne do opisanej w rozdziale 2.2 elektroluminescencji, na skutek oddziaływania fotonu dochodzi do generacji pary elektron dziura.

Do konstrukcji fotorezystorów używa się pojedynczej warstwy materiału półprzewodnikowego typu n (ze względu na większą ruchliwość elektronów porównaniu do dziur). Padający na element aktywny foton będzie powodował przeniesienie elektronu z poziomu walencyjnego na poziom przewodzenia, zwiększając tym samym przewodnictwo materiału. Wzrost przewodności będzie proporcjonalny do ilości elektronów w paśmie przewodzenia, a co za tym idzie do intensywności promieniowania padającego na fotorezystor.

Fotorezystory są urządzeniami tanimi i o niewielkich rozmiarach, sprawdzają się więc jako detektory w prostych systemach analitycznych.

3.3 Detektory fotowoltaiczne

Zdecydowanie najpopularniejszym detektorem fotowoltaicznym jest fotodioda. Podstawą jej działania jest, tak jak w przypadku fotorezystorów efekt fotoelektryczny wewnętrzny. Jednak ze względu na obecność złącza półprzewodnikowego, stanowiącego barierę potencjału, wygenerowane elektron i dziura są separowane: elektrony przemieszczane są do warstwy półprzewodnika typu n , natomiast dziury do typu p . Fotodioda może pracować jako detektor w dwóch trybach: przy braku polaryzacji oraz przy polaryzacji zaporowej. Oczywiście ze względu na większą różnicę potencjału, znacznie wydajniejsza i szybsza separacja nośników będzie miała miejsce na złączu spolaryzowanym zaporowo, stąd też ta metoda pozwala na uzyskanie większej czułości. Poza tym zubożenie warstwy w której zachodzić będzie absorpcja fotonów ogranicza niekorzystny w tym wypadku proces rekombinacji.



Rysunek 3.1 a: Przykładowe rozwiązanie konstrukcyjne budowy fotodiody; b: schemat konstrukcji chipów fotodiody PIN oraz lawinowej [13].

Przy konstrukcji fotodiod wykorzystuje się różne rozwiązania (rys.3.1), jednak ich najistotniejsze elementy są analogiczne jak w przypadku diod elektroluminescencyjnych. Najważniejsze różnice między tymi dwoma typami diod będą związane z budową chipa. Przede wszystkim chipy fotodiod posiadają znacznie większą powierzchnię, co ma poprawiać wykrywalność detektora [13]. Kolejną różnicą jest szersza gama możliwych do konstrukcji chipa materiałów półprzewodnikowych. W fotodiodach można stosować krzem i german (które notabene są półprzewodnikami pośrednimi), półprzewodniki typu II- IV oraz typu III-V [12] (podobnie jak w LED). Najistotniejszą różnicą są jednak rozmieszczenie i grubość

poszczególnych rodzajów materiałów wewnątrz chipa. Układ ten zależy od rodzaju fotodiody, jednak w celu poprawy wydajności diody dąży się do tego aby strefa absorpcyjna miała odpowiednio dużą szerokość.

Najpopularniejszym obecnie rodzajem fotodiod jest fotodioda PIN. Elementem aktywnym tego urządzenia jest heterozłącze zbudowane z trzech warstw półprzewodników: intensywnie domieszkowanych p ($p+$) i n ($n+$), oraz umieszczonej między nimi grubszej warstwy półprzewodnika samoistnego- i (w niektórych urządzeniach zamiast półprzewodnika samoistnego stosowane są warstwy o bardzo małej zawartości domieszek). Fotony mogą być absorbowane w każdej z tych warstw, jednak ze względu na specyfikę budowy fotodiody PIN najwydajniej pracują w trybie polaryzacji zaporowej.

Innym popularnym detektorem, również wymagającym polaryzacji zaporowej jest fotodioda lawinowa. Na skutek przebiecia lawinowego umożliwia ona nawet 100-krotne wzmocnienie generowanego sygnału. Większe wzmocnienie od (100 do 100 000 razy) można otrzymać stosując bardziej złożone fototranzystory Darlington'a lub bipolarne polowe [13].

3.4 Diody elektroluminescencyjne jako detektory promieniowania

Mimo pewnych różnic konstrukcyjnych, wynikających z optymalizacji budowy pod kątem zwiększenia wydajności dwóch odwrotnych procesów, już od ponad 30 lat pojawiają się doniesienia literaturowe o możliwości zastosowania diody elektroluminescencyjnej jako detektora promieniowania. Jedną z pierwszych prac o tej tematyce, przedstawiającą model prostego fotometru zbudowanego z połączonej ze wzmacniaczem operacyjnym diody elektroluminescencyjnej opublikowali już w 1976 Lindsay i Paton [14]. Jednak w większości pozycji literaturowych, jako pioniera w dziedzinie detektorów LED wymienia się amerykańskiego inżyniera F.M. Mimsa III, odwołując się do jego pracy z 1992 roku [15].

Obecnie można znaleźć prace z różnych dziedzin: fizyki, astronomii, telekomunikacji, medycyny czy meteorologii, przedstawiające proste fotometry wykorzystujące detektor LED [1,14-21]. W przeważnie są to urządzenia, w których dioda elektroluminescencyjna jest podłączona do wzmacniacza operacyjnego i wielofunkcyjnego miernika uniwersalnego [18]. Opisano też możliwość podłączenia spolaryzowanej zaporowo diody do konwertera natężenie - napięcie i pomiaru wygenerowanego w ten sposób potencjału [20,21].

Oprócz prezentacji potencjalnych zastosowań detektorów opartych na diodach elektroluminescencyjnych, udowodniono, że LED charakteryzuje się określoną czułością spektralną [20,21]. Badając czułość spektralną diod udowodniono, że LED odpowiada zmianę sygnału na promieniowanie o energii równej bądź większej niż sama emituje. Zakres tej odpowiedzi, w zależności od użytej diody waha się w granicach od 100 (diody niebieskie) do 200nm (diody czerwone) [21].

4 Diody elektroluminescencyjne (LEDy) w chemii analitycznej

Jak przedstawiłam w poprzednich rozdziałach, diody elektroluminescencyjne są popularnym źródłem światła (rozdział 2.1). Mniej znanym jest natomiast fakt, że mogą również pełnić funkcję detektora promieniowania (rozdział 3.4). W tym rozdziale przytoczę przykłady zastosowań LED w chemii analitycznej, w obydwu tych funkcjach.

4.1 LEDy jako źródła promieniowania

Diody elektroluminescencyjne ze względu na swoje liczne zalety, takie jak: zadowalającą monochromatyczność i intensywność emisji a także rozmiar i dostępność, znalazły szerokie zastosowanie jako źródła światła w analitycznych technikach optycznych. Są spotykane zarówno w urządzeniach dedykowanych do konkretnych oznaczeń [22,23] jak i w prostych, wielofunkcyjnych układach analitycznych [24-26]. Stosuje się je zarówno w pomiarach absorpcyjnych, reflektometrycznych [22,27], czy fluorymetrycznych [23,28-30] zarówno w konfiguracji detektora jak i optosensora [31-33]. Cieszą się dużą popularnością w systemach detekcyjnych tworzonych na potrzeby analizy przepływowej [24,27,34-45], elektroforezy kapilarnej [28-30,46,47] i chromatografii cieczowej [48].

Dosyć trudno wymienić wszystkie zastosowania LED w chemii analitycznej, gdyż obecnie są rozwiązaniem tak dostępnym i oczywistym, że fakt ich użycia bywa pomijany, jako nieistotny w porównaniu do szerzej omawianych problemów analitycznych. Obszerne omówienie zastosowań LEDów w chemii analitycznej przedstawiają w swoich pracach przeglądowych Dasgupta [24] oraz Diamond i O'Toole [49]. Ja poniżej przytaczam tylko niektóre z potencjalnych zastosowań.

4.1.1 Emitery LED w fotometrii

Największą popularnością diody elektroluminescencyjne zyskały w metodach opierających się na zjawisku absorpcji promieniowania – spektrofotometrii i reflektometrii. W literaturze można znaleźć doniesienia o prostych układach dedykowanych do konkretnych oznaczeń jak np. proponowane przez Matiasa, Vile i Tubino [22] urządzenie wykorzystujące zieloną LED i fotorezystor do reflektometrycznej detekcji niklu w postaci kompleksów z dimetyloglioksymem. Mimo niezwyklej prostoty układu zasilającego - źródłem prądu była

zwykła dziewięciowoltowa bateria połączona wyłącznie z potencjometrem, autorowi udało się uzyskać prostoliniową zależność oporu fotorezystora od stężenia niklu z zadowalającą wartością współczynnika korelacji dla zakresu stężeń od 0,2 do 12mM.

Zastosowanie kilku źródeł światła o różnym zakresie emisji, pozwala dostosować układ do różnego rodzaju oznaczeń i umożliwia konstruowanie bardziej uniwersalnych przyrządów. Hamilton [49] zademonstrował urządzenie do celów edukacyjnych wykorzystujące cztery różnokolorowe źródła LED umieszczonych naprzeciwko fotodiody. Jeden taki zestaw miał służyć do pomiaru absorbancji próbki, drugi identyczny służył do celów referencyjnych. Jednak ze względu na różnice w parametrach emisyjnych pomiędzy poszczególnymi diodami danego typu, nie było to optymalne rozwiązanie. Instrument udało się udoskonalić dzięki zastosowaniu światłowodów [50,51]. Z kolei grupa Hausera zaproponowała układ pomiarowy, który posiadał siedem różnych źródeł LED: dwie diody niebieskie oraz zieloną, żółtą, pomarańczową, czerwoną i IR. Od każdej z diod odchodziły dwa światłowody, z których jeden prowadził bezpośrednio do próbki, natomiast drugi do referencyjnego detektora. Dużym atutem proponowanego rozwiązania jest układ detekcyjny, wykorzystujący wzmacniacz logarytmujący. Dzięki takiemu rozwiązaniu rejestrowany sygnał analityczny był prostoliniową funkcją stężenia [50]. Urządzenie z powodzeniem zostało zastosowane do m.in. równoległego oznaczania składników mieszanin jonów metali [51]. Sorouraddin i Saadati [52] przedstawili z kolei pięciodiodowy reflektometr, w którym detektorem był fotorezystor połączony z mostkiem Wheatsona. Dzięki temu za pomocą zwykłego multimetru można było mierzyć wprost proporcjonalny do stężenia analitów sygnał napięciowy.

Opisane wyżej uniwersalne urządzenia można uprościć. Wystarczy zamiast kilku różnokolorowych źródeł promieniowania, użyć jednej wielokolorowej diody elektroluminescencyjnej. Przykłady takich systemów można znaleźć m.in. w pracach N. Gros [34,53]. Stosując jako źródło promieniowania trójkolorową diodę RGB a jako detektory fotodiody i fotorezystory, opracowała ona m.in. projekt fotometru z komorą mikroreakcyjną [53] oraz mikrotitrator ze spektrofotometryczną detekcją punktu końcowego [34].

Diody elektroluminescencyjne są często spotykanym źródłem promieniowania w detektorach stosowanych w analizie przepływowej, o różnej geometrii. Jako pierwszy wykorzystał je w tym celu Flaschka, McKeithan i Barnes [35]. W 1973 roku zaproponowali konstrukcję szklanej U-kształtnej celi przepływowej o trzydziestocentymetrowej drodze

optycznej, z przyklejonymi do ścianek diodą emiterem i fototranzystorem. Pięć lat później Betteridge ze współpracownikami [36] przedstawili model fotometru, wykorzystujący, jako źródło promieniowania zieloną LED o maksimum emisji przy 565nm, zaś jako detektor fototranzystor krzemowy, podłączony do układu konwertującego natężenie na napięcie i do pH-metru. Za pomocą celi pomiarowej, analogicznej do tej proponowanej przez Flaschke, ale ze znacznie krótszą drogą optyczną (3cm) oznaczano absorpcyjnie i refraktometrycznie jony kobaltu i miedzi. Betteridge zaproponował również inną niezwykle prostą konstrukcję detektora przepływowego o przekroju poprzecznym [37]. Pomiędzy unieruchomionymi, za pomocą nieprzezroczystej rurki silikonowej, diodą LED i fototranzystorem, prostopadle umieszczona była szklana kapilara przez którą płynął badany roztwór. Diody elektroluminescencyjne bardzo dobrze sprawdziły się w naczyniach przepływowych o geometrii spiralnej [38], planarnej [24] czy wykorzystującej połączenia światłowodowe celi reflektometrycznej [27]. Przedstawiona została również możliwość konstrukcji naczynia pomiarowego wewnątrz 5mm czerwonej diody elektroluminescencyjnej [39]. W pomalowanym ciemną farbą kloszu wytworzono dwa prostopadłe kanały o średnicy 1 i 2mm. Dwumilimetrowy kanał prostopadły do chipa LED, stanowił, drogę optyczną detektora i odpływ układu. Zmiany absorbancji mierzone były za pomocą umieszczonej na wprost odpływu fotodiodą. Tuż za diodą emiterem umieszczona była druga fotodioda przeznaczona do pomiarów referencyjnych. Urządzenie to zastosowano m.in. do oznaczeń jonów amonowych metodą Berthelota.

Próbie opracowania uniwersalnego detektora przepływowego podjęła m.in. grupa Trojanowicza [40], która zaprezentowała konstrukcję teflonowego naczynia przepływowego z pełniącym funkcję detektora fototranzystorem oraz możliwością wymiany źródła promieniowania. Użyteczność analityczną tak skonstruowanego detektora potwierdzono oznaczając bizmut (III) za pomocą oranżu ksylenolowego oraz fosforany metodą molibdenianową. Innym rozwiązaniem proponowanym przez tę samą grupę badawczą [41] był fotometr, w którym jako źródła światła zastosowano siedem diod elektroluminescencyjnych – sześć czerwonych otaczało jedną diodę, która w zależności od przyłożonego napięcia emitowała żółte bądź zielone światło. Urządzenie posiadało jeden detektor - fotodiodę umieszczoną naprzeciwko żółto-zielonej LED. Światło z sześciu czerwonych diod skupiane było na fotodiodzie za pomocą specjalnej soczewki. Aby pomiar prowadzony za pomocą jednego detektora był możliwy dla wszystkich zakresów emisji,

źródła emitowały milisekundowe sygnały. Dlatego też w urządzeniu zastosowana została fotodioda, która ma mniejszą czułość niż fototranzystor, charakteryzuje się natomiast krótszym czasem odpowiedzi. Instrument umożliwiał równoczesne oznaczanie zawartości dwu lub trójskładnikowych mieszanin różnobarwnych kompleksów metali przejściowych. Należy podkreślić, że przyrząd wykorzystywał pełny zakres spektralny dostępnych ówczesznie LED, miał więc mieć charakter uniwersalny. Obecnie taki wielozadaniowy detektor może mieć znacznie prostszą budowę. Można np. zastosować jako źródło promieniowania pojedynczą wielobarwną diodę elektroluminescencyjną [38].

Opisane wyżej przykłady dotyczą w znacznej mierze zastosowania diody elektroluminescencyjnej we wstrzykowej analizie przepływowej (FIA). Potwierdzona została też użyteczność LED w zestawieniu z innymi technikami przepływowymi: MCFA (*MultiCommutation Flow Analysis*) [42], MPFA (*MultiPumping Flow Analysis*) [43], MSFA (*MultiSyringe Flow Analysis*) [44], SIA (*Sequential Injection Analysis*) [45] etc. Ze względu na niewielki rozmiar LED są wiodącym rozwiązaniem w systemach mikroprzepływowych. Collins i Lu [46,47] w swoich badaniach nad systemami lab-on-a-chip wykorzystywali, jako źródła czerwone i zielone diody elektroluminescencyjne, których promieniowanie za pomocą mikroobiektywu skupiane było na matrycy fotodiod i fotopowielaczu. Układy te z powodzeniem były wykorzystane w mikrosystemach do rozdzielania i oznaczania jonów metali przejściowych [46] oraz radionuklidów [47].

Detektory przepływowe z diodami elektroluminescencyjnymi stosowane są również w technikach rozdzielania. Dzięki powstaniu diod emitujących promieniowanie w coraz to dalszym obszarze UV, Schmid, Macka i Hauser [48] przedstawili proste urządzenie wykorzystujące diodę UV (250- 350nm) i fotodiodę, które może służyć, jako tani, uniwersalny detektor w wysokosprawnej chromatografii cieczowej.

Ciekawym zagadnieniem jest konstrukcja prostych wielofunkcyjnych układów pomiarowych. Grupa Dasgupty [24], przedstawiła propozycję konstrukcji wielofunkcyjnego fotometru, który przetestowany został pod kątem przepływowych pomiarów absorbancji, fluorescencji a także badań spektroelektrochemicznych. Dla modelowych układów chemicznych urządzenie charakteryzowało się bardzo dobrymi parametrami analitycznymi. Należy przy tym zaznaczyć, że praca ta miała mieć charakter poradnika, jak zbudować własny uniwersalny fotometr, jednak odtworzenie przedstawionych układów zasilających i detekcyjnych, może stanowić duży problem przy niedostatecznej znajomości elektroniki.

Inną koncepcję tzw. SLIM (*Simple, Low power, Inexpensive, Microcontroller based photometr*) przedstawili Ingle i Cantrell [25]. Proponowane urządzenie, posiadało trzy emiter LED: czerwony, żółty i niebieski oraz fotodiode, pełniącą funkcję detektora. Według zapewnień autorów całkowity koszt wykorzystanych w nim podzespołów nie przekraczał 25USD. Bardzo prosty dziewięcioelementowy układ, składający się z diody elektroluminescencyjnej, fotodiody, pary rezystorów, potencjometru, kondensatora baterii/zasilacza i multimetru przedstawili Elsholz i inni [26]. Potwierdzeniem sprawności tego prostego urządzenia było oznaczanie w warunkach przepływowych: błękitu bromotymolowego, amoniaku - za pomocą błękitu indofenolowego i dwutlenku azotu w formie barwników azowych.

4.1.2 Emitery LED we fluorymetrii

Diody elektroluminescencyjne spotykane są również technikach fluorymetrycznych. Projekt fluorymetru do celów edukacyjnych zaproponował m.in. Wigton i inni [54]. W urządzeniu jako źródło promieniowania wzbudzającego zaproponowano diodę UV o maksimum emisji przypadającym na 360nm, natomiast rolę detektora pełnić miała fotodioda krzemowa. Całkowita cena urządzenia miała nie przekraczać 80 USD przy czym ok. 25% ceny stanowiły wydatki na detektor oraz konieczny przy tego typu oznaczeniach filtr, uniemożliwiający docieranie do detektora rozproszonemu promieniowaniu źródła. Właśnie konieczność stosowania drogich komponentów optycznych, ogranicza stosowanie LED w technikach fluorymetrycznych.

Diody elektroluminescencyjne wykorzystywane są we fluorymetrycznych układach detekcyjnych, stosowanych w elektroforezie kapilarnej, zarówno w jej klasycznej formie jak i w systemach lab-on-a-chip. Yang z ekipą [28] przedstawił system do rozdzielania i oznaczania znakowanych izotiocyanianem fluoresceiny aminokwasów. Układ detekcyjny składał się z „super jasnej” (ultra-bright) niebieskiej LED, będącej emitery promieniowania wzbudzającego, filtru antyinterferencyjnego oraz, ponieważ układy tego typu wymagają bardzo czułego detektora, fotopowielacza. Huo i inni [29] zaproponowali bardzo podobny układ, z tą różnicą, że jako źródło wybrał dwubarwną, czerwono - niebieską LED co pozwoliło na zwiększenie potencjalnych możliwości analitycznych detektora i umożliwiło oznaczanie pięciu różnych barwników fluorescencyjnych. Natomiast Chabinyč i inni [30] przedstawili

detektor systemu lab-on-a-chip, w którym światłowody doprowadzają promieniowanie wzbudzające do powierzchni chipa, a pomiar intensywności fluorescencji wykonywany jest zatopioną w podstawie chipa prototypową mikrofotodiodą lawinową - będącą alternatywą dla drogich fotopowielaczy.

Interesujące urządzenie przedstawili w swojej pracy Zhu i współpracownicy [23]. Opracowali oni fluorescencyjny cytometr, w którym jako źródła promieniowania wzbudzającego zostały zastosowane dwie niebieskie diody elektroluminescencyjne. Jako detektor, a właściwie urządzenie obrazujące, zastosowano 3,2M pikselową matrycę CMOS aparatu fotograficznego z telefonu komórkowego. Wykonany z prostych i stosunkowo tanich elementów przyrząd miał postać nakładki na telefon komórkowy. Mimo to otrzymane za jego pomocą wyniki nie odbiegały znacząco od tych uzyskanych za pomocą profesjonalnego mikroskopu fluorescencyjnego,

4.1.3 Emitery LED w konstrukcji optosensorów

Diody elektroluminescencyjne mogą również z powodzeniem pełnić funkcję źródeł promieniowania w optosensorach. Meredith, Maidment i Gibbs [31] omawiają potencjalne możliwości dostępnych komercyjnie optod czułych na amoniak wykorzystujących reflektometryczną detekcję zmian zabarwienia membrany. Autorzy wspominają o możliwości stosowania różnych chromojonoforów i w zależności od ich rodzaju różnobarwnych LED, jako źródeł promieniowania.

Grupa z Politechniki Warszawskiej [32] zaprezentowała czujnik wyposażony w trzy diody elektroluminescencyjne pokryte cienkimi membranami o określonej funkcji: pHmetrycznej (dioda czerwona o maksimum emisji przy 630nm, pokryta filmem zawierającym błękit tymolowy), oznaczeń jonów wapnia (dioda zielona o $\lambda_{\max}=560\text{nm}$, pokryta chromojonoforem *chlorofosorazo(III)*) oraz dzięki zastosowaniu termochromofora także temperatury (dioda czerwona o maksimum emisji przy 650nm pokryta polimerem domieszkowanym chlorkiem kobaltu). Autorzy zaproponowali również układ stabilizujący emitery wykorzystujący zintegrowane z zasilaniem i umieszczone bezpośrednio za nimi, fotodiody.

LED sprawdzono również pod kątem przydatności jako źródła promieniowania w optodach fluorescencyjnych. Müller i Hauser [33] zaproponowali zastosowania niebieskiej

diody elektroluminescencyjnej i fotodiody w spektroelektrochemicznym oznaczaniu rozpuszczonego w wodzie CO₂.

4.2 LEDy jako detektory promieniowania

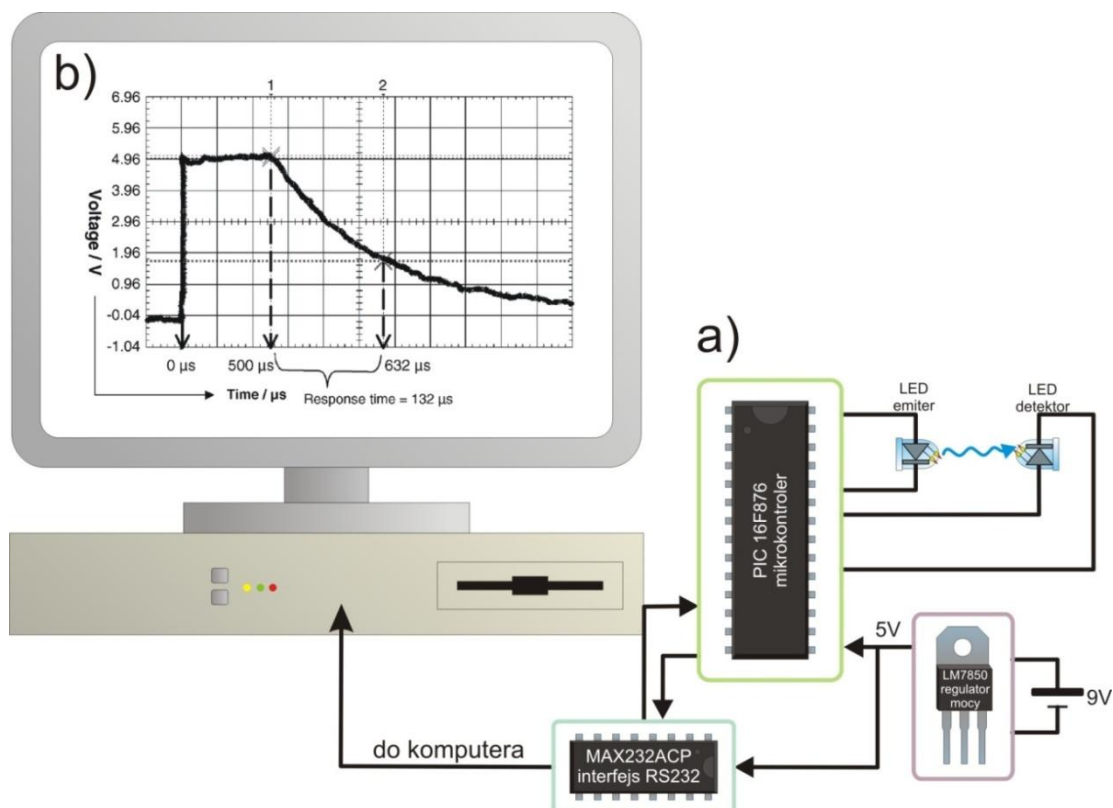
W rozdziale 3.2 przedstawiłam potencjalne możliwości zastosowania diody elektroluminescencyjnej w funkcji detektora promieniowania w różnych dziedzinach nauki. Od niedawna detektor LED znajdują swoje miejsce również w chemii analitycznej.

4.2.1 Detektory LED w fotometrii

Pierwszy raz propozycję zastosowania LED jako detektorów w chemii analitycznej przedstawili Berry, Harris i Williams [55]. W proponowany przez nich fotometrze źródłem światła była wolframowa lampa halogenowa, natomiast funkcję selektywnego detektora pełniła matryca z różnokolorowych diod elektroluminescencyjnych. Każda z diod posiadała swój własny regulowany wzmacniacz sygnału. Tak skonstruowany układ zastosowano do kolorymetrycznych oznaczeń pH i stężenia jonów metali ciężkich. W toku badań zaobserwowano, że niebieska dioda, ze względu na dość niską czułość wymaga dwa razy większego niż pozostałe detektory wzmocnienia sygnału.

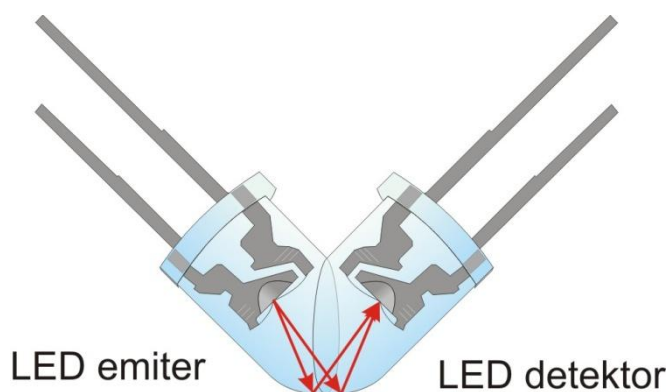
Większość prac, w których opisano, analityczne zastosowania detektorów LED powstała w grupie badawczej z Dublin City University pod kierownictwem D. Diamonda [56-68]. Proponowane przez nich urządzenie, tzw. PEDD (Paired Emitter Detector Diode) to podłączona w kierunku zaporowym dioda LED, która oświetlana jest 100 milisekundowymi impulsami światła z odpowiednio dobranego emitera (także diody LED). Wykorzystuje się tu fakt, że spolaryzowany zaporowo LED, tak samo jak fotodiode posiada pewną pojemność i może zachowywać się jak kondensator. Na elektrodach LED pod wpływem impulsu świetlnego generowany jest fotoprąd, który powoduje spadek wartości przykładanego do niej napięcia. Tak jak w przypadku kondensatora, szybkość tego spadku zależy od ładunku, prądu wygenerowanego na złączu a co za tym idzie od intensywności oświetlenia. Autorzy zaprojektowali układ elektroniczny wykorzystujący mikrokontroler PIC, port komunikacyjny, regulator mocy oraz baterię (9V) do zasilania emitera i układu detekcyjnego (rys. 4.1.a). Za pomocą układu mierzono czas, w jakim napięcie spada od 5 do 1,7V (rys. 4.1.b). Wartości te uznawane są za logiczne „zero” (1,7V) i „jedynek” (5V) układu. 5V to typowa wartość potencjału na portach wyjściowych mikrokontrolerów, stąd też napięciem takim

spolaryzowana zaporowo jest dioda detektor. Nie zostało natomiast dokładnie wyjaśnione, dlaczego jako logiczne zero autorzy wybrali wartość 1,7V. Prawdopodobnie wynika to z czynników aparaturowych układu rejestrującego. Z teoretycznego modelu doświadczenia wynika, że czas „rozładowania” diody jest wprost proporcjonalny do natężenia światła a zatem wykazuje logarytmiczną zależność od stężenia. Układ ten został przetestowany w pomiarach reflektometrycznych [56] i absorpcyjnych [57].



Rysunek 4.1 a) budowa systemu pomiarowego proponowanego przez grupę Diamonda [56]; b) przykładowy przebieg rozładowania diody detektora [58].

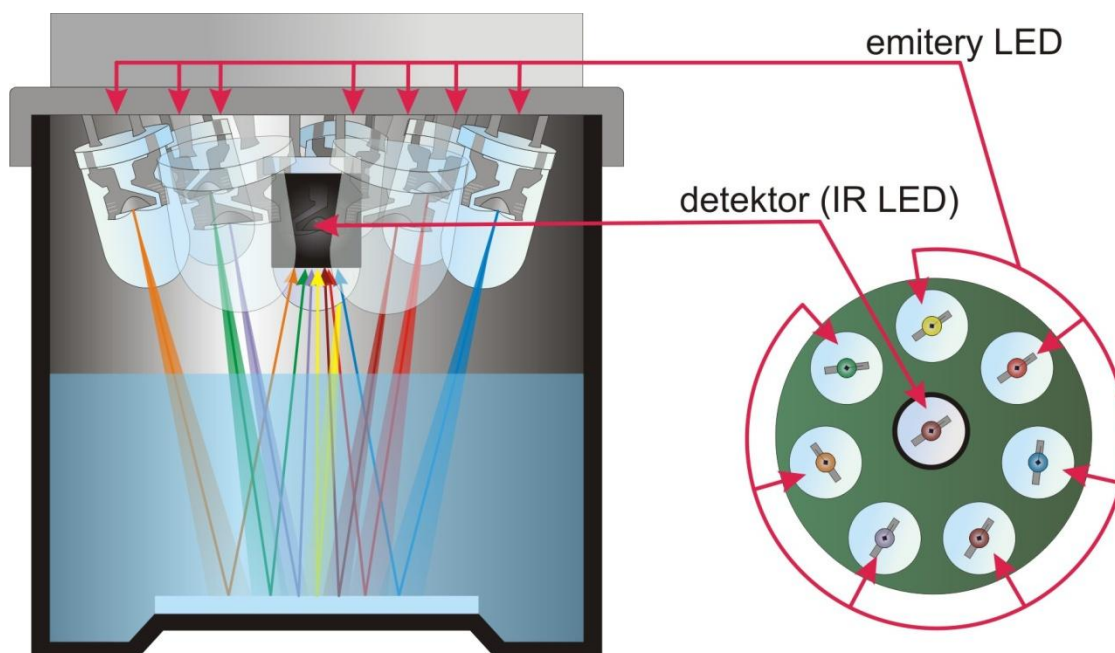
Do oznaczeń reflektometrycznych [56] autorzy skonstruowali specjalną sondę optyczną składającą się z dwóch identycznych - odpowiednio zeszlifowanych i sklejonych ze sobą diod elektroluminescencyjnych (rys. 4.2). Emitowane przez źródło promieniowanie po przejściu przez badany roztwór i odbiciu od powierzchni zwierciadła powracało do detektora. W tym czasie część promieniowania zostawała zabsorbowana przez próbkę. Układ ten użyty był do oznaczania stężenia oraz wyznaczania pK_a wskaźników pH: Rodaminy B, żółcieni nitrazynowej i fioletu bromokrezolowego, dla których otrzymano prostoliniowe charakterystyki układów odpowiednio w zakresach: 0-10 μM ; 0,4- 100 μM i 0- 4 μM .



Rysunek 4.2 Schemat detektora reflektometrycznego [56].

Metodę reflektometryczną zastosowano również do równoczesnych pomiarów stężenia tychże barwników: czerwieni metylowej, fioletu bromokrezolowego i błękitu anilinowego. Autorzy zaproponowali tzw. fotometr „dyskotekowy” (*disco photometer*) [57] (rys. 4.3). Urządzenie posiadało siedem różnych emiterów otaczających diodę IR, stanowiącą uniwersalny detektor. Metodyka pomiaru, polegająca na wysyłaniu przez każde ze źródeł krótkich impulsów świetlnych pozwoliła na prowadzenie 7 równoczesnych pomiarów. Stężenia poszczególnych składników były obliczane na podstawie znajomości widm absorpcyjnych badanych substancji, i wskazań odpowiednich detektorów na podstawie odpowiednio wyprowadzonego układu równań.

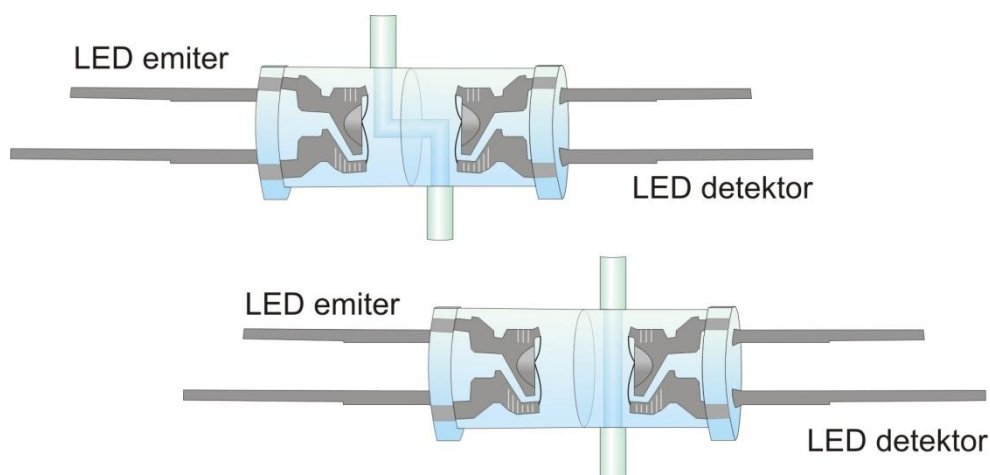
Proponowany przez irlandzkich naukowców przyrząd przystosowano również do pomiaru absorbancji [58]. Stosując celę pomiarową własnej konstrukcji przeprowadzono szereg pomiarów mających na celu zarówno potwierdzenie przydatności analitycznej układu (poprzez oznaczenia zieleni bromokrezolowej czy kompleksów jonów żelaza(II) z fenatroliną), jak i uzasadnienie doboru detektora. Badania porównawcze przeprowadzone dla diody elektroluminescencyjnej oraz pięciu fotodiod pokazały, w tym trybie pomiarowym (pomiar czasu rozładowania diody), LED charakteryzuje się około stukrotnie większą czułością niż fotodioda.



Rysunek 4.3 Schemat fotometru dyskotekowego.

Taki sam układ wykorzystano do oznaczania jonów ołowiu(II) i kadmu(II) w postaci ich kompleksów z zielenią malachitową [59]. Rolę źródeł i detektorów pełniły jednakowe czerwone diody elektroluminescencyjne. Dla jonów Cd^{2+} granica wykrywalności wynosiła 5ppb a dla Pb^{2+} 20ppb, a zakres prostoliniowości odpowiednio 20-80ppb i 0-2ppm.

Ze względu na dobre parametry detektora PEDD w pomiarach stacjonarnych, został on również przystosowany do pracy w warunkach wstrzykowej analizy przepływowej [60]. Naczynie przepływowe skonstruowano z dwóch sklejonych ze sobą diod elektroluminescencyjnych, które spłaszczone i wytworzono wewnątrz dwa prostopadłe kanały (rys. 4.4). Tak jak we wcześniejszych pracach pierwsze oznaczenia przeprowadzone zostały dla roztworów wskaźnika – zieleni bromokrezolowej. W trakcie badań zaobserwowano, że zmniejszanie natężenia promieniowania źródła powoduje wzrost czasu „rozładowania” się diody, co z kolei wiąże się ze wzrostem czułości oznaczenia.



Rysunek 4.4 Schematy detektorów przepływowych PEDD [60- 62].

Innym przykładem praktycznego zastosowania PEDDów w analizie przepływowej było oznaczanie fosforanów metodą molibdenianową z zastosowaniem zieleni malachitowej [61]. Naczynie przepływowe wykonano, podobnie jak wcześniej, skleając ze sobą diodę detektor (czerwona 660nm) i diodę emiter (czerwona 636nm) - rysunek 4.4. Jednak tym razem roztwór przepływał przez równoległy do powierzchni styku kanał wywiercony w detektorze i co za tym idzie urządzenie posiadało bardzo krótką drogę optyczną.

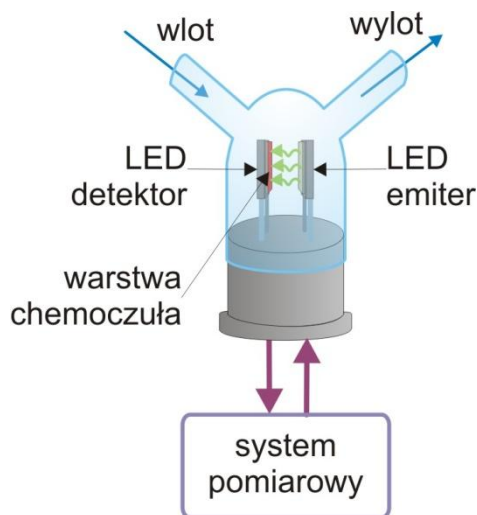
Przepływowy detektor typu PEDD przetestowano również w funkcji detektora w chromatografii cieczowej [62]. Żółtozielony (574nm) emiter i czerwony (620nm) detektor, w wariacie z poprzecznym kanałem przepływowym zastosowano do oznaczeń jonów magnezu, wapnia, strontu i baru w postaci ich kompleksów z o-krezoftaleiną. Metoda pozwalała na uzyskanie granicy oznaczalności od 0,38ppm dla magnezu do 24,4ppm dla baru. Detektor został również zastosowany w wysokosprawnej chromatografii cieczowej [63]. Zielone źródło (500nm) i czerwony detektor (660nm) zastosowano do oznaczeń jonów manganu(II) i kobaltu(II) w formie barwnych kompleksów z 4-(2-pirydylazo)-rezorcynolem po wcześniejszym rozdzielaniu na kolumnie chromatograficznej. W zoptymalizowanych warunkach otrzymano zakres prostoliniowości od 0,9 do 100μM dla kompleksów manganu i 0,2 do 100μM dla kobaltu. Ze względu na dużą wartość do układu wprowadzono drugą referencyjną parę PEDD z niebieskim emiterem [64]. Pozwoliło to na ograniczenie efektów szumu nawet o 42%.

4.2.2 Detektory LED we fluorymetrii

W chwili rozpoczęcia przeze mnie badań nie było doniesień literaturowych o możliwości stosowania diody elektroluminescencyjnej jako detektora promieniowania w pomiarach fluorymetrycznych. Najnowsze publikacje dotyczące tego zagadnienia zostaną omówione w podsumowaniu rozprawy (rozdział 14).

4.2.3 Detektory LED w konstrukcji optosensorów

Również w dziedzinie konstrukcji optosensorów z detektorem LED prym wiedzie grupa z DCU, zwłaszcza w dziedzinie czujników gazowych [65-67]. Pierwszym urządzeniem tego typu był czujnik amoniaku [65]. Składał się z zielonej i czerwonej powierzchniowo montowanej diody elektroluminescencyjnej (rys. 4.5). Na powierzchni czerwonego detektora metodą „*drop coating*” unieruchomiono film zawierający p-nitrofenylnitrozoaminę, która w obecności amoniaku zmienia barwę z żółtej na czerwoną. Układ pozwalał na oznaczanie amoniaku na poziomie ppm. Ponadto dowiedziono, że przez dobór odpowiedniego materiału filmu i odpowiedniej pary emiter-detektor można stworzyć układ czuły na inne gazy.



Rysunek 4.5 Konstrukcja sensora gazowego [65].

Podobne urządzenie skonstruowane z powierzchniowo montowanych LED zostało zastosowane w bezprzewodowej sieci czujników kwasowości gazów [66]. Jako źródło i detektor promieniowania wybrane zostały dwie czerwone diody. Na powierzchnię diody emitera, również metodą „*drop coating*”, naniesiona była warstwa chemoczuła z błękitu bromofenolowego, który zmieniał barwę z niebieskiej na żółtą w obecności par kwasu

octowego. Ponieważ odbarwiona membrana w środowisku obojętnym dosyć wolno powracała do stanu początkowego, opracowano polipierolowe ramie, które w zależności od przyłożonego napięcia odkształcało się w charakterystyczny sposób przemieszczając membranę chemoczułą ze strefy pomiaru w parę amoniaku, który powodował szybki powrót filmu do stanu początkowego [67].

Prowadzono również badania nad sensorem pracującym w środowisku wodnym [68]. W badaniach użyto pary czerwonych LED. Optomembrana z octanu celulozy z dodatkiem zieleni bromokrezolowej została naniesiona metodą „*dip-coating*” na powierzchnię detektora. Warstwę chemoczułą o takim samym składzie naniesiono również na powierzchnię fotorezystora, co umożliwiło zarówno ocenę prawidłowości działania membrany jak i porównanie dwóch typów detektorów. Rejestrując zależności czasu rozładowania diody i oporności od pH, i wyliczając na tej podstawie wartość pKa zieleni bromokrezolowej, zaobserwowano, że LED jest detektorem dokładniejszym niż LDR. Niestety ze względu na duże szумы, otrzymane za pomocą sensora PEDD wartości obarczone były dużo większym błędem.

Zagadnienie gazowych sensorów optycznych jest przedmiotem dalszych badań. Najnowsze prace poruszające tą tematykę zostaną przytoczone w podsumowaniu rozprawy (rozdział 13).

4.3 Najnowsze kierunki badań sparowanych diod elektroluminescencyjnych

Przegląd literatury dotyczącej zastosowania diod elektroluminescencyjnych w chemii analitycznej wyraźnie pokazuje, że ich rola jako emiterów promieniowania jest już doskonale znana i ugruntowana (rozdział 4.1). Nowym kierunkiem badań jest stosowanie LEDów jako detektorów promieniowania (rozdział 4.2). Możliwość wykorzystania obu tych przeciwstawnych funkcji w jednym systemie analitycznym wydaje się oczywista. Zaskakująco do chwili podjęcia przeze mnie tego tematu tylko jeden zespół badawczy (grupa z Dublin City University) publikował prace poświęcone tym zagadnieniom. Prace te omówiłam w rozdziale 4.2.

W czasie trwania moich badań zaczęły pojawiać się nowe doniesienia literaturowe często korespondujące z moimi pracami badawczymi. Te publikacje zostaną omówione w kontekście rezultatów moich badań w podsumowaniu tej rozprawy (rozdział 13).

5 Cel i plan badań

Jak pokazałam w części literaturowej pracy, diody elektroluminescencyjne jako względnie monochromatyczne źródła światła są obecne w chemii już od 40 lat [29,30]. Podobnie jest w przypadku najstarszych doniesień o zastosowaniu LED jako selektywnych detektorów promieniowania [14]. Jednak mimo licznych zalet połączenie obu tych rozwiązań nie jest zbyt szeroko omawiane i do momentu powstania niniejszej pracy stanowiło obiekt zainteresowania tylko jednej grupy badawczej (grupa Diamonda z Dublin City University). Jest to tym bardziej zaskakujące, że w przytoczonych wcześniej pracach pokazano (rozdział 4.2.1), iż w odpowiednich warunkach dioda elektroluminescencyjna może być lepszym detektorem niż powszechnie stosowane fotodiody [58]. Jednak omówione w rozdziale 4.2 rozwiązanie pozwalające na zastosowanie diody LED jako detektora do celów analitycznych wymaga od potencjalnego użytkownika zaawansowanych umiejętności zarówno w dziedzinie elektroniki jak i programowania. Dlatego podstawowym celem mojej pracy było opracowanie prostszej metody pomiarowej, rozwiązania, które byłoby bardziej dostępne.

Jak zaznaczyłam w rozdziale 4.2.2 do czasu rozpoczęcia przeze mnie badań nie było żadnych doniesień literaturowych o możliwości stosowania diody elektroluminescencyjnej jako detektora promieniowania w pomiarach fluorymetrycznych. Generalnie, w przyrządach fluorymetrycznych wykorzystujących emitery LED, stosuje się detektory charakteryzujące się dużym wzmocnieniem sygnału (rozdział 4.1.2), nie zaś proste fotodiody. Można się więc spodziewać, że czułość diody elektroluminescencyjnej może nie być zadowalająca do tego typu pomiarów. Z drugiej jednak strony w jednej ze swoich prac Diamond udowadnia, że LED może być bardziej czułym detektorem niż fotodiody [58]. Stąd też postanowiłam sprawdzić przydatność diod elektroluminescencyjnych jako detektorów fluorymetrycznych.

Kolejną, nie poruszaną zbyt szeroko w literaturze kwestią, jest zastosowanie detektorów LED do konstrukcji sensorów. Stąd też kolejnym moim celem było opracowanie zintegrowanego optosensora adaptowalnego do pracy w warunkach analizy przepływowej o realnym zastosowaniu analitycznym.

Koncentrując się na sprawdzeniu powyższych zagadnień, swoje badania podzieliłam na następujące etapy:

1. Ocena parametrów emisyjnych i detekcyjnych diod elektroluminescencyjnych oraz systemów do pomiaru sygnału generowanego przez sparowane diody elektroluminescencyjne.
2. Konstrukcja fotometru opartego na sparowanych diodach elektroluminescencyjnych.
3. Przystosowanie fotometru PEDD do pracy w warunkach analizy przepływowej.
4. Konstrukcja fluorymetru typu PEDD.
5. Konstrukcja fluorymetrycznego detektora przepływowego typu PEDD.
6. Konstrukcja przepływowych optosensorów typu PEDD.
7. Zastosowanie otrzymanych systemów do oznaczeń próbek rzeczywistych.

6 Aparatura, akcesoria i odczynniki

Aparatura:

- Przyrządy do pomiaru napięcia/ siły elektromotorycznej:
 - pH-metr precyzyjny OP-208/1, Radelkis
 - multimetr z testerem diod UT30C, UNI-T
 - multimetr z interfejsem RS232 UT10B, UNI-T
 - multimetr z interfejsem RS232 VC820, Voltcraft
 - multimetr z interfejsem USB AX-18B, Axiomet
- Diody elektroluminescencyjne 5mm
 - Podczerwone, 900nm , QUED 222, Fairchild Semiconductor
 - Czerwone, 660nm, 3Cd 383-2SDRCS530-A4, Everlight
 - Czerwone, 650nm, 4Cd L-53SRC-F, Kingbright Electronic
 - Czerwone, 630nm, 7Cd OSHR5131A-QR, Optosupply
 - Czerwone, 630nm, 4,2Cd OSHR5161A-NO, Optosupply
 - Czerwone, 630nm, 1,5Cd z płaskim czołem OSR5MA57E1A-LM, Optosupply
 - Pomarańczowe, 610nm 50Cd OSOR5111P, Optosupply
 - Żółte, 595nm, 10 Cd OSYL5131A-ST, Optosupply
 - Żółte, 595nm, 4,2-5,8Cd OSYL5111A-PP, Optosupply
 - Żółte, 595nm, 2,5-3 Cd LL-503UYC-Y24DC ,Lucky Light
 - Żółtozielone, 570nm, 4,2Cd OSUG5111A-OP, Optosupply
 - Zielone, 525nm, 10Cd OSPG5131A-ST, Optosupply
 - Zielone, 505nm, 10Cd OSBG5121A-TU, Optosupply
 - Niebieskie, 475nm, 5,8Cd OSUB5131A-PQ, Optosupply
 - Niebieskie, 470nm, 1,5Cd z płaskim czołem OSUB5MA57E1A-IJ, Optosupply
 - Niebieskie, 430nm, 50-150mCd L-53MBC, Kingbright Electronic
 - Fioletowe, 405nm, 68mW/Sr OSSV5131A, Optosupply
 - Fioletowe, 405nm, ETG-5UV-405-15, ETG
 - Fioletowe, 400nm, ETG-5UV-400-30, ETG
 - Fioletowe, 395nm, ETG-5UV-395-15, ETG
 - UV, 375nm, 11mW/sr LED375011-40AWOM06, Amecam
 - UV, 370nm, 6mW/sr LED70006-50AWOM06, Amecam

- UV, 365nm, 3mW/sr LED365003-40AWOM06, Amecam
- Diody elektroluminescencyjne 10mm
 - Czerwone, 630nm, 1-1,6Cd L-813BSRC/C ,Kingbright Electronic
 - Niebieskie, 470nm, 1-1,5Cd LL-1003BC-B4-1C ,Lucky Light
- Elementy układów zasilających
 - Płytki prototypowe stykowe WB-104-1 i zestaw przewodów
 - Wzmacniacze operacyjny L272
 - Tranzystory pnp BC547
 - Stabilizatory napięcia UA78205
 - Diody prostownicze 1n4148
 - Rezystory, kondensatory i inne drobne podzespoły
- Elementy układów przepływowych
 - Pompa perystaltyczna Milipuls 3, Gilson
 - Zawory wstrzykowe Rheodyne 5020
 - Pompy mikrosolenoidowe 120SP1210-4ET, Bio-ChemValve
 - Zawory elektromagnetyczne trójdrożne 100T3MP12-62-5, Bio-ChemValve
 - Sterownik zaworów i pomp KSP-2
 - 1mL pompa strzykawkowa Micro BU 2030 ,Crison Allela
 - Ośmiopozycyjny zawór selekcyjny Crison
 - 45 - pozycyjny autosampler Microsampler Crison
 - Węże teflonowe o średnicy wewnętrznej 0,8 i 0,4 mm, Cole Parmer
- Przyrządy do pomiarów referencyjnych
 - Spektrofotometr UV-2401 PC, Shimadzu
 - Spektrofluorymetr USB2000, Ocean Optics

i inny drobny sprzęt laboratoryjny

Odczynniki

➤ Barwniki i fluorofory

- Błękit bromotymolowy (BBT), POCh
- Czerwień Kongo (CK), POCh
- Błękit bromofenolowy (BBF), POCh
- Zieleń bromokrezolowa (ZBK), POCh
- Błękit tymolowy (BT), POCh
- Tymoloftaleina (TF), POCh
- Fluoresceina, POCh
- Siarczan chininy, Sigma Aldrich
- Odczynnik Bradford, Sigma Aldrich
- Kalceina, Sigma Aldrich
- Fluorescamina (Fluram), Sigma Aldrich
- Ryboflawina, Sigma Aldrich

➤ Enzymy i ich substraty

- Ureaza (EC 3.5.1.5) wyizolowana z fasoli Jaś 83U/mg, Sigma Aldrich
- Fosfataza alkaliczna (EC 3.1.3.1) wyizolowana z błony śluzowej jelita cienkiego wołu 10U/mg, Sigma Aldrich
- Oksydaza glukozy (EC 1.1.3.4) wyizolowana z kropidlaka *Aspergillus Niger* 0,13U/mg, Sigma Aldrich
- Mocznik, POCh
- Monofluorofosforan (MFP), Sigma Aldrich
- α -D- glukoza, Sigma Aldrich

➤ wzorce białek

- Albumina wyizolowana z surowicy krwi wołowej (BSA), Sigma Aldrich
- γ -globulina wyizolowana z krwi wołowej (BBG) Sigma Aldrich
- Albumina z surowicy krwi ludzkiej (HSA) Sigma Aldrich
- γ -globulina wyizolowana z krwi ludzkiej (HBG) Sigma Aldrich
- Kliniczne wzorce białka, Cormay
- Ludzka surowica syntetyczna, fizjologiczna, Cormay
- Ludzka surowica syntetyczna, patologiczna, Cormay

- Materiały do przygotowania filmu błękitu pruskiego
 - Heksacyjanożelazian potasu, POCh
 - Kwas pirolobenzoesowy (Pyr-Bac), Sigma Aldrich
 - Folia do drukowania Staedtler Lumocolor
- Pozostałe odczynniki klasy Cz.d.a (POCh)

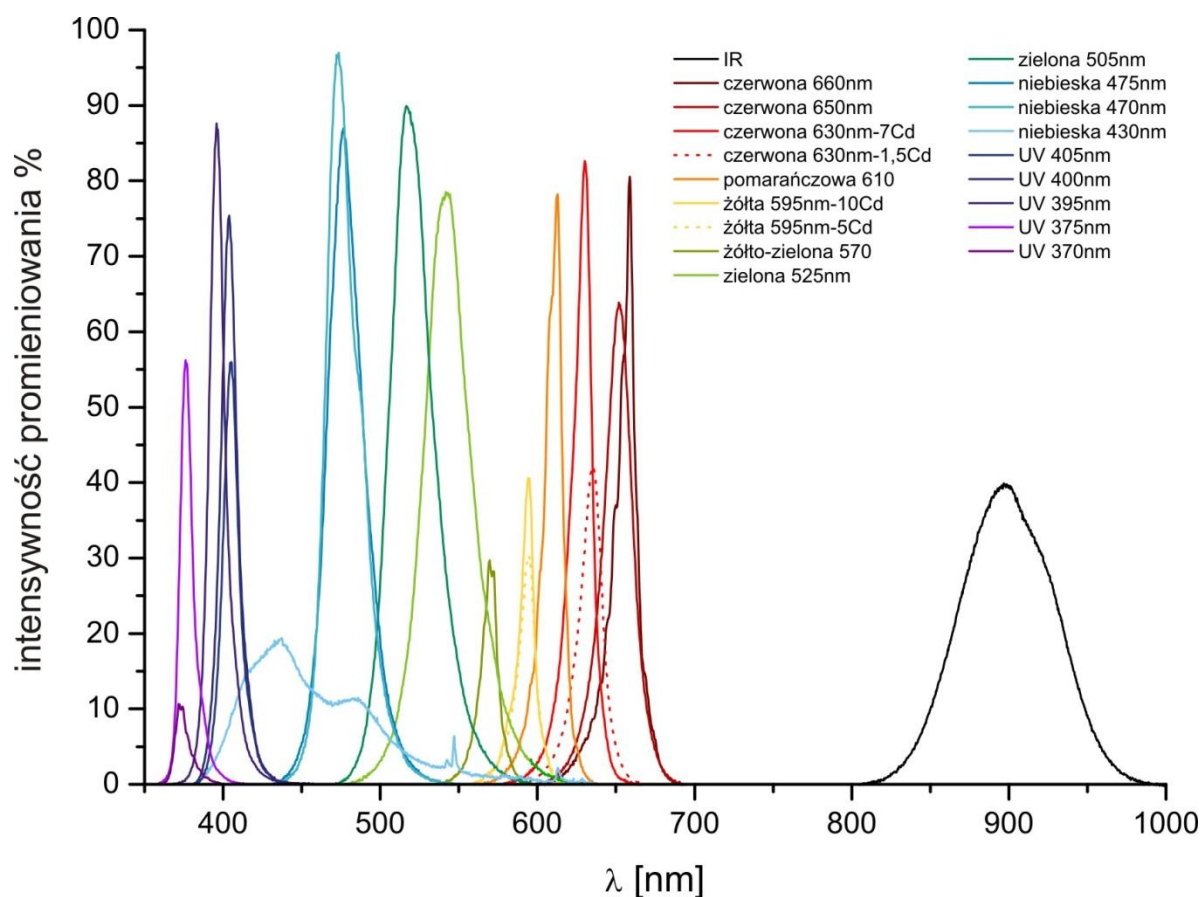
7 Badania wstępne diod elektroluminescencyjnych

Rozpatrując diody elektroluminescencyjne jako źródła promieniowania do zastosowań analitycznych należy brać pod uwagę kilka istotnych czynników. Przede wszystkim należy dobrać źródło o odpowiednim dla analitu zakresie emisji. Ponadto należy zapewnić optymalne warunki pracy, zwłaszcza w kwestii zasilania, ponieważ zmiany w intensywności emitowanego promieniowania będą powodować niepowtarzalność pomiarów.

Część literaturowa niniejszej pracy zawiera przykłady dowodzące, że LED może być z powodzeniem zastosowany jako detektor fotometryczny (rozdział 4.2). Przytoczone prace powstałe w głównej mierze w jednej grupie badawczej przedstawiają skomplikowany układ elektroniczny sterujący pracą diod pełniących funkcję emitera i detektora. Jednak taki układ PEDD można zastąpić prostszym rozwiązaniem.

7.1 Diody elektroluminescencyjne jako źródła światła

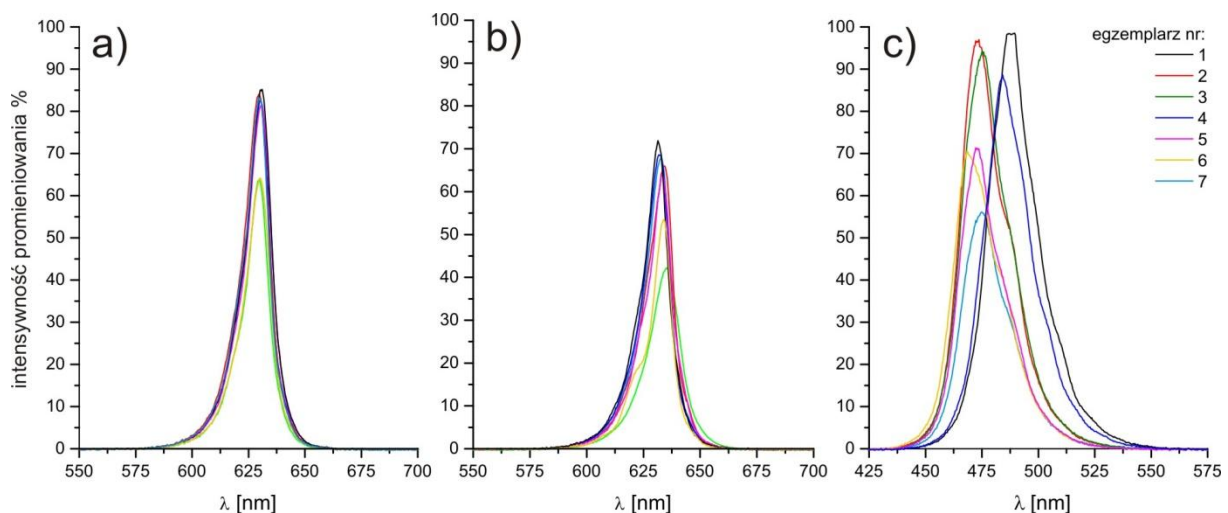
Diody elektroluminescencyjne mogą emitować światło o dość wąskim spektrum. Obecnie na rynku dostępnych jest wiele rodzajów LED różniących się między sobą zarówno długością fali jak i intensywnością emisji. Na rysunku 7.1 przedstawiam widma LED, którymi dysponowałam w ramach prowadzonych przeze mnie badań, zarejestrowane za pomocą spektrofotometru (Ocean Optics 2000). Wyniki potwierdzają tezę, że diody elektroluminescencyjne mogą stanowić źródło względnie monochromatycznego promieniowania w prawie całym zakresie spektralnym od poczerwieni przez promieniowanie widzialne aż do bliskiego nadfioletu. Na wykresie widoczna jest luka w zakresie od ok. 700 do ok. 800nm. Brak tego typu emiterów wiąże się z ich niewielką popularnością, a co za tym idzie z ich ograniczoną dostępnością (górną granicą czułości spektralnej oka ludzkiego to właśnie ok. 700nm co ogranicza potencjalne możliwości zastosowań tego typu źródeł). Nie ulega jednak wątpliwości, że diody elektroluminescencyjne mogą pełnić funkcję emitera oraz źródła promieniowania wzbudzającego w technikach spektralnych bazujących na promieniowaniu z zakresu widzialnego i bliskiego UV.



Rysunek 7.1 Widma emisji wybranych LED.

Pewien problem może stanowić fakt, że widma emisyjne różnych egzemplarzy diod elektroluminescencyjnych tego samego rodzaju, będą się nieznacznie różnić między sobą parametrami emisji - zarówno intensywnością jak i długością fali maksymalnej emisji. Wykresy a, b i c na rysunku 7.2 pokazują widma emisyjne dla siedmiu różnych egzemplarzy LED tego samego typu zarejestrowane w identycznych warunkach.

Jak widać, między poszczególnymi egzemplarzami mogą pojawiać się istotne różnice. Jednakże czerwone diody elektroluminescencyjne wykazują większą niż pozostałe zbadane rodzaje, powtarzalność zarówno pod względem maksimum emisji, jak i intensywności, co zapewne wynika z lepszego dopasowania struktury sieci krystalicznej zastosowanego w nich półprzewodnika (AlGaInP) niż ma to miejsce w przypadku niebieskich LED, gdzie materiałem półprzewodnikowym jest InGaN.

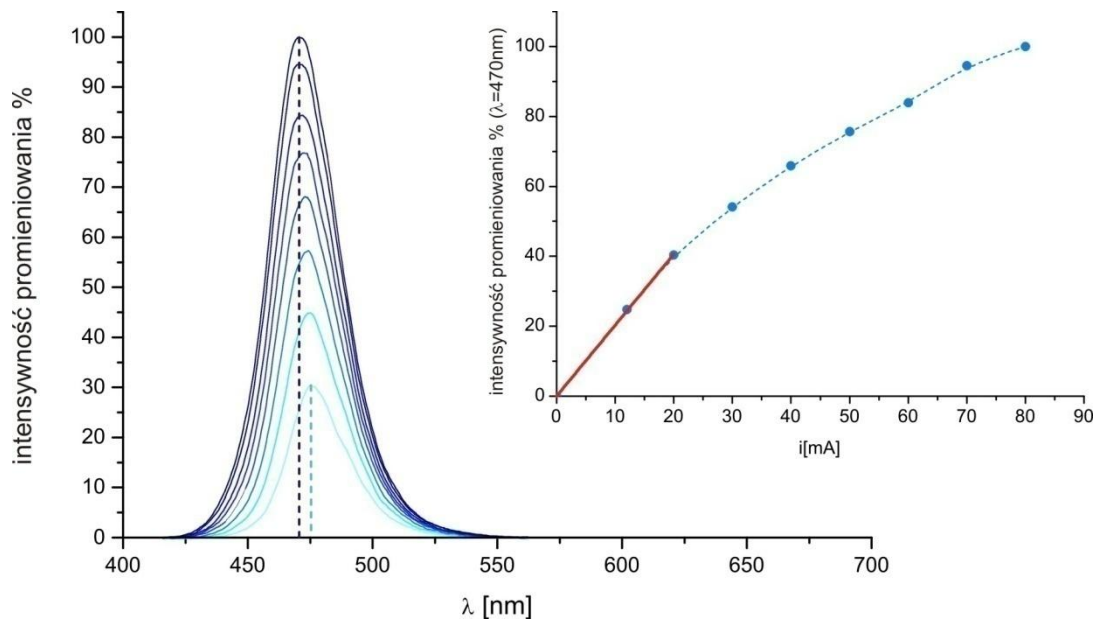


Rysunek 7.2 Widma emisyjne siedmiu a)- czerwonych 7Cd, b) czerwonych 1,5Cd i c)- niebieskich 0,5Cd LED.

Można przyjąć, że nieznaczne przesunięcia maksimum emisji nie wpłynęły znacząco na wyniki oznaczeń, ponieważ elektronowe widma absorpcyjne mają zazwyczaj znacznie większą szerokość spektralną niż widma emisji poszczególnych LED. Znacznie gorzej sytuacja się przedstawia w przypadku intensywności emisji, która przecież może mieć duży wpływ na wiarygodność otrzymywanych wyników. Producenci dla poszczególnych modeli LED podają wartość światłości (wyrażaną w kandelach) przy określonej wartości prądu zasilania, w większości przypadków jest to jednak wartość uśredniona obciążona 20% błędem, ze względu na różnice między poszczególnymi egzemplarzami. I jak pokazano na rysunku 7.2.c, w niektórych przypadkach różnica w intensywności emitowanego promieniowania może sięgać 50%. Istotnym jest więc, przy zmianie diody emitera, ponowne sporządzenie charakterystyki LED i optymalizacja warunków prądowych.

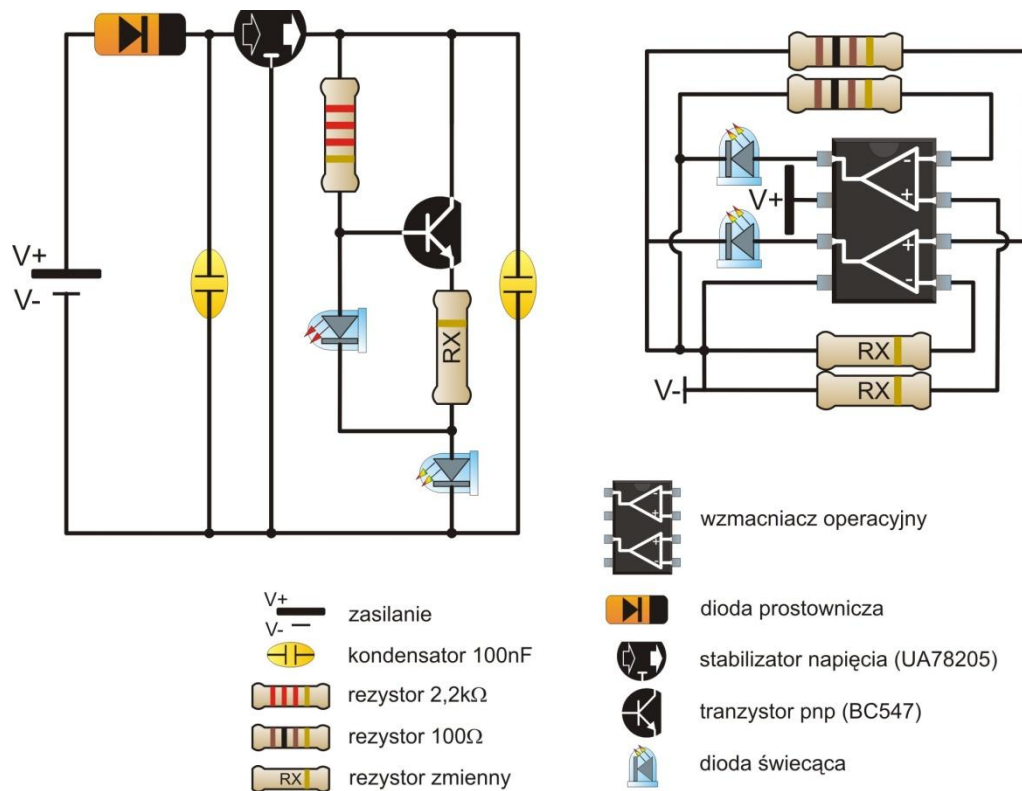
Diody elektroluminescencyjne należy zasilać prądem stałym o minimalnej wartości napięcia, w zakresie od 1,5V (dla diody czerwonej) do 4,5V (dla diod fioletowych i ultrafioletowych). Najczęstsza znamionowa wartość natężenia to 20mA, jednak w toku badań prowadziłam pomiary także przy znacznie mniejszych (0,9mA) i większych (80mA) wartościach prądów zasilania. Jak widać na rysunku 7.3, zarejestrowana dla jednej z niebieskich diod zależność intensywności emisji od natężenia prądu zasilania jest liniowa dla mniejszych prądów (do ok 20mA). Dla wyższych wartości prądów zasilania widoczne jest nieznaczne przesunięcie maksimum emisji w kierunku fal dłuższych oraz wolniejszy wzrost intensywności emitowanego promieniowania, co z kolei powoduje że cały przebieg ma charakter zbliżony do logarytmicznego. Jest to prawdopodobnie związane ze zbyt dużym

wzrostem ilości nośników w obszarze aktywnym złącza i związanym z tym zjawiskiem przelewu nośników z obszaru aktywnego do bariery (rozdział 2.2). Przy zasilaniu LED małymi prądami należy się liczyć z tym, że nawet małe zmiany prądu mogą powodować duże zmiany rejestrowanego sygnału. Z drugiej strony, w przypadku dużych prądów, powyżej 20mA różnice nie będą już tak istotne.



Rysunek 7.3 Zależność intensywności emisji od natężenia prądu zasilania niebieskiej diody.

Nie ulega więc wątpliwości, że krytycznym dla jakości dalszych badań będzie stworzenie odpowiedniego, stabilnego systemu zasilającego. W toku badań stosowałam dwa różne urządzenia zasilające, których schematyczna budowa przedstawiona jest na rysunku 7.4. Oczywiście można korzystać z prostszych rozwiązań. Można np. podłączyć LED bezpośrednio do odpowiedniej baterii lub zasilacza, ewentualnie dołączając do układu rezystor lub potencjometr, jeżeli potrzebna jest regulacja prądu. Takie rozwiązanie nie będzie jednak generować stabilnego prądu, a co za tym idzie może powodować wahania intensywności emisji. Z tego powodu przedstawione układy zawierają odpowiednie półprzewodnikowe elementy stabilizujące. W przypadku pierwszego obwodu są to: dioda prostownicza (zapobiegająca zmianom polaryzacji), stabilizator napięcia i tranzystor - utrzymujące stałe parametry prądu. W drugim układzie wszystkie te funkcje spełnia wzmacniacz operacyjny. Dodatkowo, wybrany chip zawiera dwa wzmacniacze, dzięki czemu możliwe jest niezależne zasilanie dwóch diod elektroluminescencyjnych, co okazało się przydatne w dalszych etapach badań.



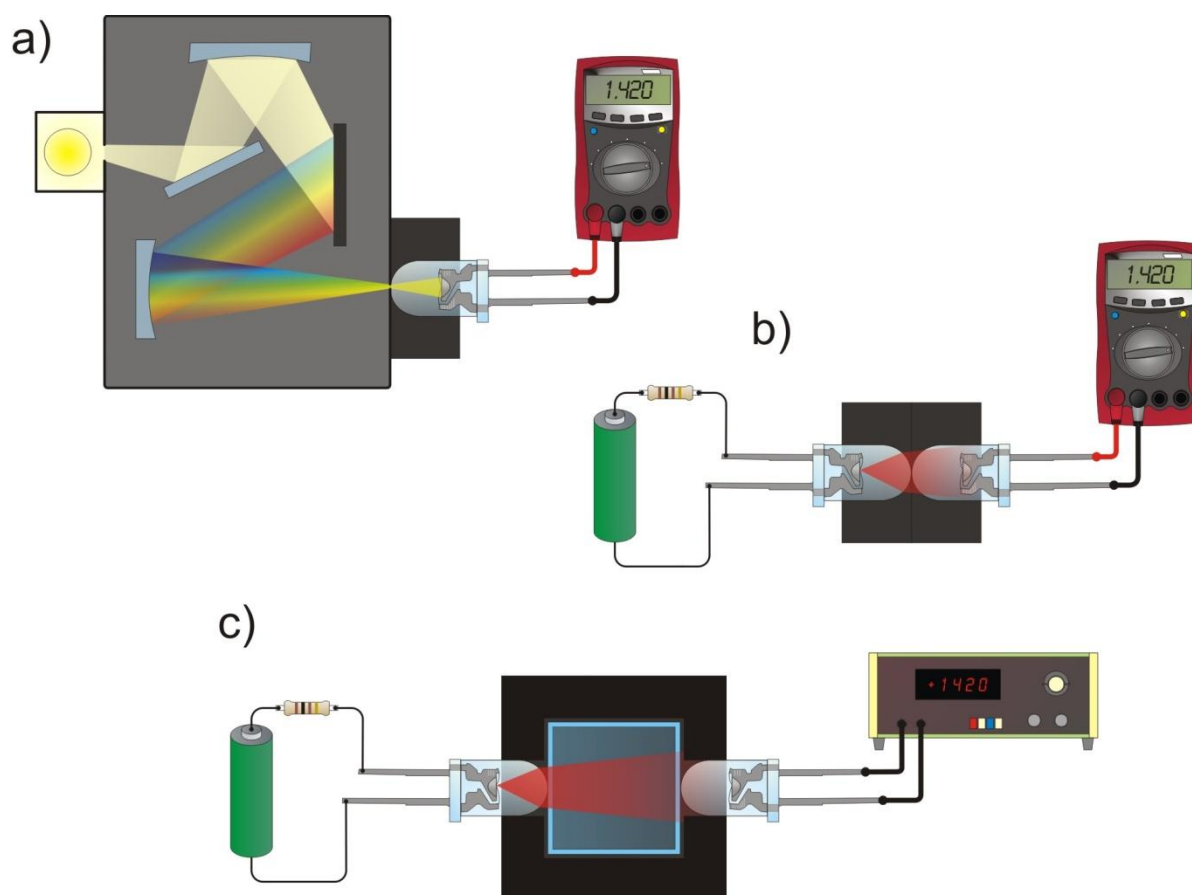
Rysunek 7.4 Schematy budowy układów zasilających.

Innym istotnym elementem układów jest rezystor RX. Zmieniając rezystancję tego opornika można regulować wartość natężenia prądu zasilającego. Jest to istotne, gdyż zmiana intensywności emisji źródła pozwala dostosować urządzenie pomiarowe do pracy z różnymi technikami analitycznymi, różnymi analitami i różnymi zakresami ich stężeń. Używane przeze mnie w toku badań urządzenie wyposażone było w 50 oporników o rezystancji od 20 do 10 000Ω co pozwalało na dyskretną zmianę wartości natężenia prądu zasilającego w bardzo szerokim zakresie: w przypadku pierwszego urządzenia od 2,5 do 110mA, w przypadku drugiego od 0,7 do 70mA. Oczywiście w tym miejscu można umieścić potencjometr, co wydaje się prostszym rozwiązaniem, jednakże w toku prowadzonych badań rozwiązanie takie okazało się mniej praktyczne.

7.2 Diody elektroluminescencyjne jako detektory światła

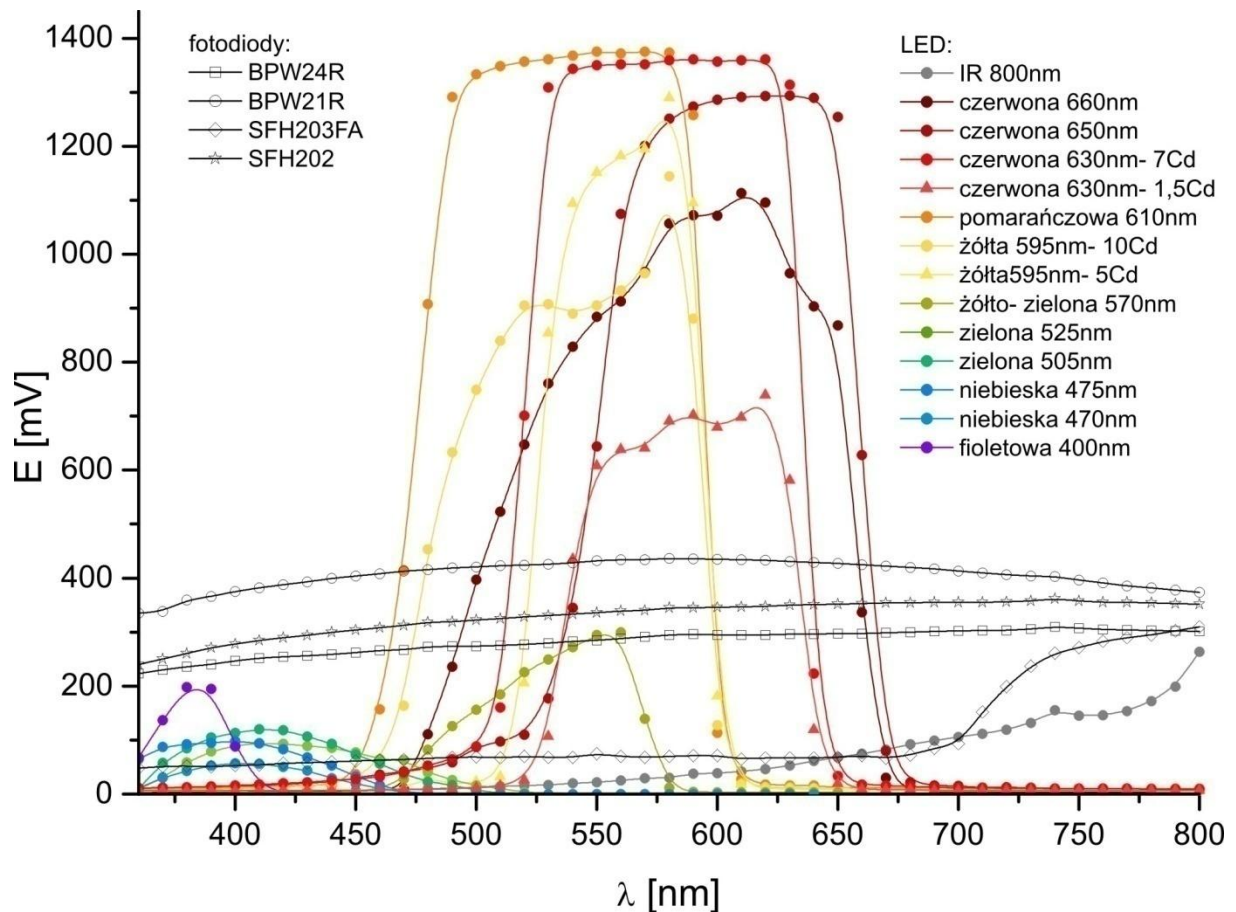
W rozdziałach 3.4 i 4.2 przedstawiłam publikacje omawiające możliwości zastosowania LED w funkcji detektora promieniowania. Generalnie, większość zaprezentowanych rozwiązań wymaga spolaryzowania diody detektora w kierunku zaporowym. Zapewne wynika to z tego, że zastosowanie polaryzacji zaporowej zwiększa obszar aktywny złącza, a co za tym idzie detektor pracujący w tym trybie charakteryzuje się znacznie większą czułością. Stąd też fotodiody konstruowane są przeważnie tak aby przykładając napięcie zaporowe, możliwie najmocniej poszerzyć granice obszaru aktywnego i zwiększyć wydajność zjawiska fotoelektrycznego [12]. Tymczasem w celu poprawienia wydajności procesu fotoluminescencji grubość obszaru aktywnego złącza w diodach elektroluminescencyjnych nie powinna przekraczać kilkunastu mikrometrów np. przez zastosowanie technologii podwójnego heterozłącza [8]. Ta różnica konstrukcyjna powoduje, że stosowanie diod elektroluminescencyjnych jako spolaryzowanych zaporowo detektorów nie musi być zasadne, mimo licznych zalet tego rozwiązania w przypadku fotodiody.

Problem taki nie pojawia się natomiast w przypadku pomiarów fotowoltaicznych. Co więcej tego typu rozwiązanie jest znacznie prostsze, nie wymaga stosowania skomplikowanych układów elektronicznych, zaś do pomiaru wygenerowanego sygnału wystarczy urządzenie do pomiaru napięcia elektrycznego. W toku eksperymentu wykorzystałam dwa typy tego typu urządzeń: pH-metr oraz proste multimetry z funkcją woltomierza. Charakteryzujący się wysoką opornością wewnętrzną pH-metr umożliwiał pomiar siły elektromotorycznej, natomiast za pomocą woltomierza rejestrowane było napięcie wytwarzane przez oświetlaną diodę. Sygnał potencjałowy mierzony za pomocą tych urządzeń pozwolił na określenie głównych cech detektorów LED, takich jak selektywność i powtarzalność.



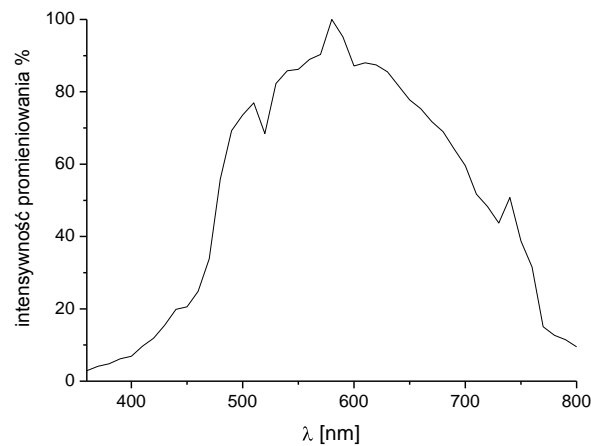
Rysunek 7.5 Schematy układów badawczych zastosowanych do określania parametrów diod elektroluminescencyjnych jako detektorów promieniowania.

Test selektywności przeprowadziłam dla tych samych egzemplarzy LED których widma pokazano na rysunku 7.1. Diody umieszczano w specjalnym statywie bezpośrednio za szczeliną monochromatora spektrometru Spekol (rysunek 7.5.a). Długość fali, promieniowania padającego na detektor, w zakresie od 350 do 800nm przy interwale 10nm, ustawiałam ręcznie za pomocą pokrętła monochromatora. Generowany sygnał mierzyłam za pomocą multimetru. Otrzymane wyniki są pokazane na rysunku 7.6. Oprócz diod elektroluminescencyjnych w eksperymencie użyłam również czterech typowych fotodiod (PIN oraz krzemowych). Uzyskane wyniki pokazują że, LED są detektorami znacznie bardziej selektywnymi niż fotodiody. Co więcej w fotowoltaicznym trybie pomiaru, LED mogą generować znacznie wyższe sygnały i w związku z tym wykazują znacznie większą czułość.



Rysunek 7.6 Charakterystyki spektralne wybranych detektorów LED i fotodiod

Należy zwrócić uwagę że emisja, zastosowanego w eksperymencie, źródła promieniowania nie była jednakowa w całym zakresie badanego promieniowania (rysunek 7.7)- znacznie spadała intensywność emisji poniżej 470nm co wpływa na wyniki ilościowe dla pomiarów dla światła o tych długościach fali. Dlatego też sprawdziłam czy detektory, których maksimum absorpcji przypada na ten zakres, są w stanie wygenerować wyższe sygnały.



Rysunek 7.7 Widmo emisji lampy spektrofotometru Spekol.

W tym celu poszczególne detektory oświetlałam intensywnym promieniowaniem, generowanym przez LEDy, z zakresu ich największej czułości spektralnej. Umieściłam naprzeciwko siebie dwie diody elektroluminescencyjne: emiter zasilany prądem ok 80mA oraz podłączony do woltomierza detektor (rysunek 7.5.b). Otrzymane wartości zostały w tabeli 7.1. zestawione z podanymi przez producenta wartościami napięcia przewodzenia.

Tabela 7.1 Maksymalny zmierzony sygnał i napięcie przewodzenia wybranych LED.

Rodzaj diody detektora	Maksymalny sygnał napięciowy	Napięcie przewodzenia
	[V]	[V]
IR 800nm	1,000	1,70
Czerwona 660nm	1,508	1,80
Czerwona 650nm	1,625	1,85
Czerwona 630nm, 7Cd	1,650	2,10
Czerwona 630nm, 1,5Cd	1,560	2,10
Pomarańczowa 610nm	1,615	2,20
Żółta 595nm, 10Cd	1,610	2,20
Żółta 595nm, 5Cd	1,580	2,00
Żółto- zielona 570nm	1,860	2,60
Zielona 525nm	1,981	3,10
Zielona 505nm	2,113	3,30
Niebieska 475nm	2,300	3,30
Niebieska 470nm	2,272	3,20

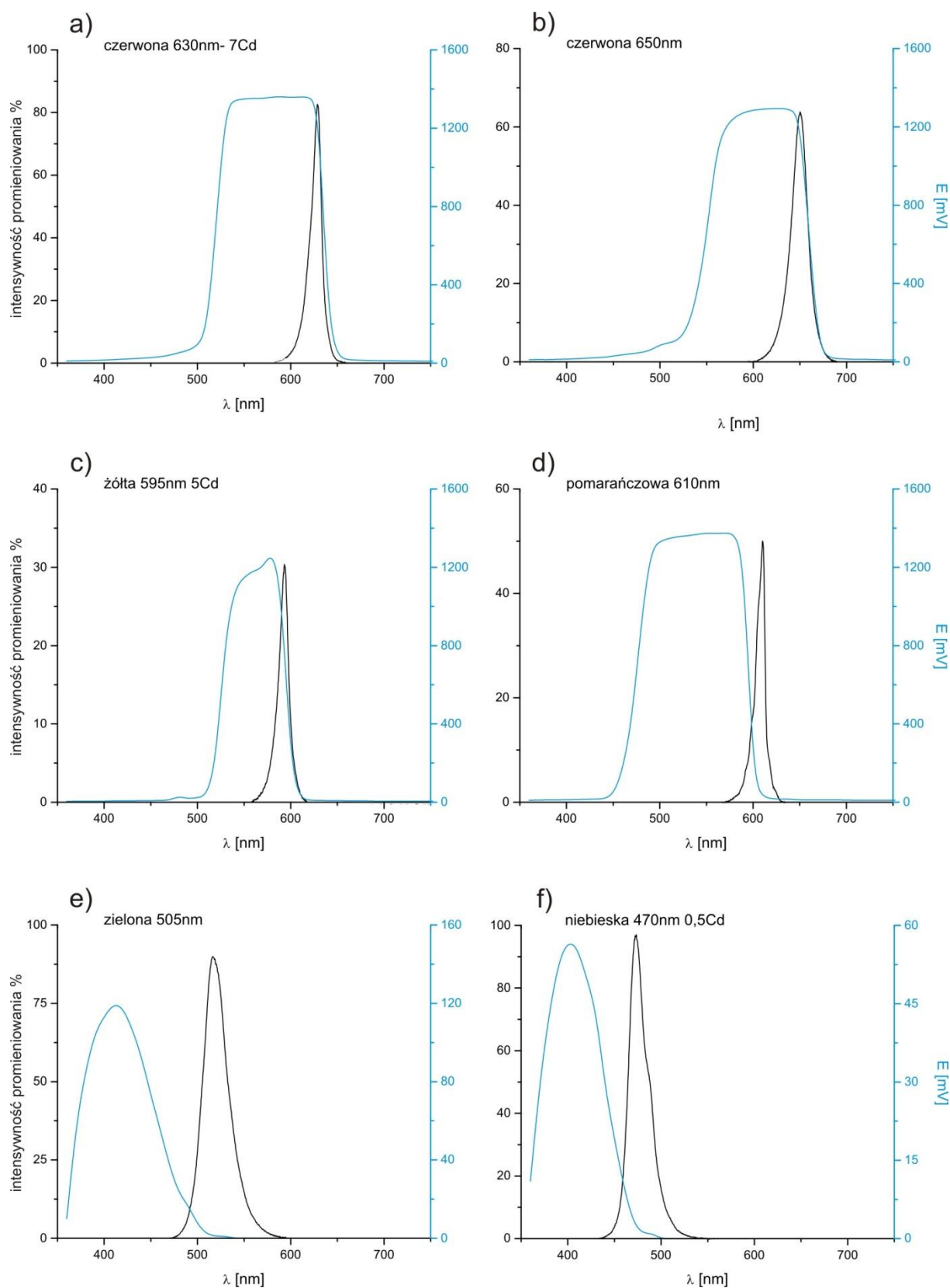
Eksperyment wykazał, że zielone i niebieskie diody elektroluminescencyjne, mogą wygenerować znacznie wyższe sygnały niż te zarejestrowane w teście z użyciem spektrofotometru. Co więcej, im większa przerwa energetyczna złącza i większe napięcie potrzebne do zasilania LED, tym większy sygnał potencjałowy jest ona w stanie wygenerować pracując w trybie detektora, jednakże maksymalny zarejestrowany sygnał, nie przekracza wartości napięcia przewodzenia.

Po zestawieniu widma emisyjnego (rys 7.1) i absorpcyjnego (rys.7.6) dla tej samej diody elektroluminescencyjnej zaobserwowałam, trzy rodzaje występujących między nimi zależności:

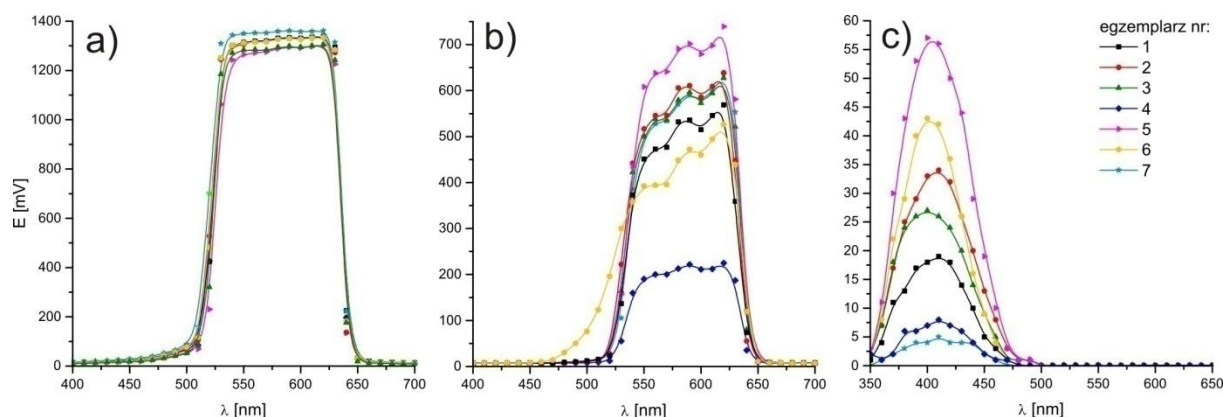
- ✓ Widmo emisji w pełni nachodzi na widmo absorpcji (rys. 7.8 a i b)
- ✓ Widmo absorpcji jest nieznacznie przesunięte w kierunku fal krótszych (rys. 7.8 c i d)
- ✓ Widmo emisji i absorpcji tylko nieznacznie się nakrywają (rys. 7.8 e i f).

Ta ostatnia zależność występuje wyłącznie przypadku zielonych i niebieskich diod elektroluminescencyjnych. W pozostałych przypadkach trudno dopatrzeć się znaczącej korelacji między powyższymi zależnościami a rodzajami LED. Różnice te najprawdopodobniej wynikają z innej budowy chipa (zastosowanych przy konstrukcji heterozłącza oraz warstwy rozpraszającej półprzewodników, ich rodzaju, ilości domieszek).

Powyższe zależności przede wszystkim potwierdzają tezę, że dioda elektroluminescencyjna jest selektywnym detektorem, o dość wąskim zakresie czułości spektralnej (nie przekraczającym 150nm), reagującym na zmiany intensywności promieniowania o energii większej niż sama emituje. Światło o energii równej wysokości przerwy energetycznej LED może ale nie musi powodować wystąpienia różnicy potencjału na złączu. Będzie to raczej miało miejsce w przypadku diod niebieskich i zielonych których maksimum czułości spektralnej jest przesunięte nawet o 10nm względem maksimum emisji. Narzuca to konieczność przeprowadzania wstępnych eksperymentów w celu doboru optymalnej, na potrzeby konkretnych oznaczeń, pary emiter- detektor.



Rysunek 7.8 Korelacje widm emisji i absorpcji wybranych diod elektroluminescencyjnych.



Rysunek 7.9 Charakterystyki spektralne siedmiu identycznych diod a-czerwonych 630nm 7Cd, b- czerwonych 630nm 1,5Cd, c- niebieskich 470nm.

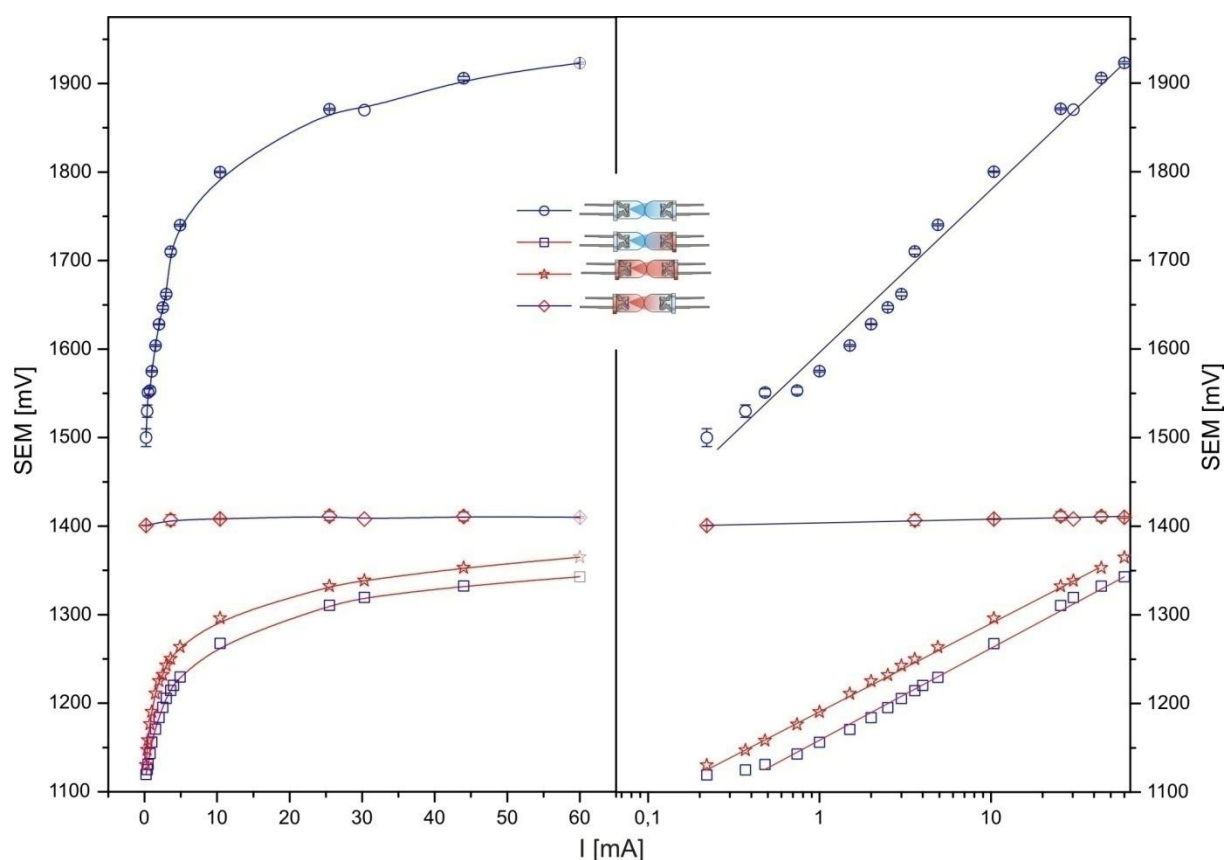
Kolejną zbadaną przeze mnie cechą detektorów LED była ich odtwarzalność. W tym celu sporządziłam charakterystyki spektralne dla siedmiu różnych egzemplarzy, trzech typów LED (rys. 7.9). Były to te same diody, które zostały wykorzystane w teście odtwarzalności emisji (rys. 7.2), oznaczenia diod pozostały bez zmian.

Również w przypadku detekcji promieniowania diody elektroluminescencyjne nie wykazują dużej odtwarzalności. Co więcej porównując dane z wykresów na rysunkach 7.2 i 7.9 nie można zauważyć korelacji między wydajnością emisji i czułością. Najintensywniej świecące niebieskie diody – z numerami 1 i 2 są jak widać są detektorami o średniej i dosyć małej czułości. Nie ulega natomiast wątpliwości, co widać na przykładzie diody czerwonej 7Cd, że odtwarzalność emisji przekłada się na odtwarzalność w detekcji promieniowania.

Ostatni test przeprowadzony dla detektorów LED miał na celu sprawdzenie jak zmienia się potencjał wygenerowany przez diodę wraz ze wzrostem intensywności padającego na nią promieniowania. Eksperyment przeprowadziłam dla czerwonych (630nm, 1,5Cd) i niebieskich (470nm, 0,5Cd) LED. Ponieważ oporność wewnętrzna diody ma charakter dynamiczny i zależy od płynącego przez nią prądu, korzystniejszy w tym przypadku był pomiar wygenerowanej siły elektromotorycznej. Dlatego też połączyłam diodę detektor z pH-metrem. Różne intensywności emitowanego promieniowania uzyskiwałam przez zmiany prądu zasilania diody emitera. Schemat zastosowanego układu pomiarowego pokazałam na rysunku 7.5.c, a otrzymane wyniki przedstawiam na rysunku 7.10.

W większości zbadanych kombinacji zależność między siłą elektromotoryczną generowaną przez detektor a intensywnością padającego na niego promieniowania ma charakter logarytmiczny. Widoczny jako liniowy przebieg w skali liniowej, brak czułości

spektralnych w przypadku, kiedy niebieski detektor oświetlałam czerwonym źródłem. Jest to wynik zgodny z oczekiwaniem, spójny z zarejestrowaną wcześniej charakterystyką spektralną tego typu detektora (rys. 7.6). Ciekawostką jest natomiast różny od zera potencjał generowany na nieoświetlonym detektorze LED. Najprawdopodobniej wynika on z istnienia warstwy zubożałej w obszarze złącza (rozdział 2.2). Zupełnie inaczej jest w przypadku pomiarów napięcia, gdzie płynący prąd ciemny pozwala na prawie całkowitą depolaryzację złącza.



Rysunek 7.10 Zależność siły elektromotorycznej na detektorze od natężenia prądu emitera dla różnych kombinacji czerwonej i niebieskiej LED.

Powyższe rezultaty pokazują, że możliwa jest konstrukcja fotometru PEDD, analogicznego do tego zaproponowanego przez grupę Diamonda, w którym sygnałem analitycznym będzie napięcie bądź siła elektromotoryczna generowana przez oświetlany LED. Ponadto, można stwierdzić, że mimo drobnych niedoskonałości, takich jak słaba odtwarzalność pomiędzy poszczególnymi egzemplarzami, diody elektroluminescencyjne to sprawne i selektywne detektory optoelektroniczne.

7.3 Podsumowanie

W toku badań wstępnych potwierdziłam, że diody elektroluminescencyjne mimo nienajlepszej powtarzalności mogą być stosowane zarówno jako źródła jak i detektory promieniowania. Zaproponowałam prostą potencjometryczną metodę pomiaru sygnału wytwarzanego przez LED detektory. Zaobserwowałam też, że w takiej potencjometrycznej konfiguracji pomiarowej, LEDy generują wyższy sygnał niż typowe fotodiody. Najistotniejszą obserwacją jest jednak stwierdzenie selektywności LED detektorów - otóż są one wrażliwe tylko na promieniowanie o równej bądź nieco wyższej energii (krótszej długości fali) niż same emitują gdy są używane w konwencjonalny sposób jako źródła światła. Na uwagę zasługuje również fakt, że ich czułość ma charakter wykładniczy, podobnie jak w przypadku konwencjonalnych fotodiod.

W dalszych rozdziałach pracy zostaną przedstawione różne urządzenia analityczne otrzymane na drodze integracji diod elektroluminescencyjnych pełniących funkcję źródła i detektora promieniowania, czyli tzw. sparowane diody elektroluminescencyjne opisywane akronimem PEDD (ang. *Paired Emitter Detector Diode*).

8 Fotometryczne pomiary kuwetowe.

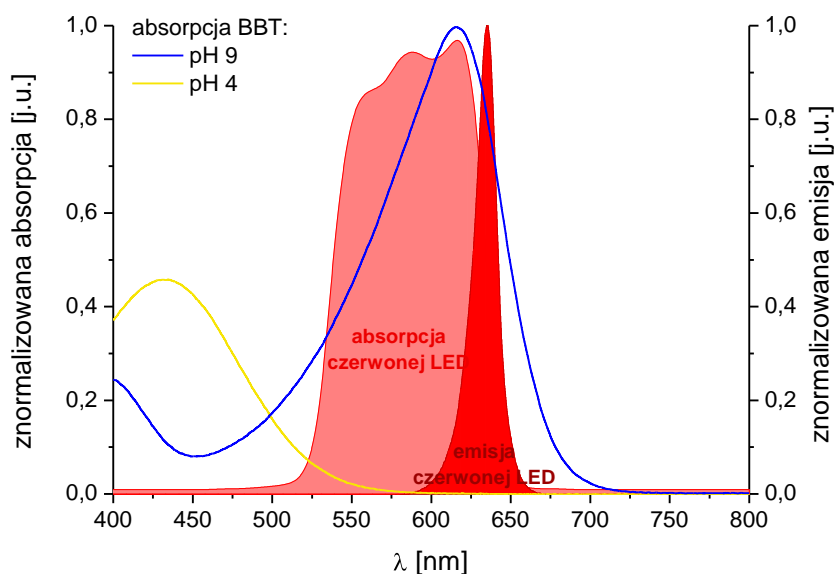
Pierwszym etapem badań było opracowanie zestawu, dedykowanego do kuwetowych pomiarów fotometrycznych. W skład takiego zestawu powinny wchodzić: źródło promieniowania wraz z urządzeniem zasilającym, detektor z rejestratorem oraz celi pomiarowa. Funkcję emitera i detektora promieniowania mają oczywiście pełnić diody elektroluminescencyjne. Schematy układów zasilających oraz propozycje rejestratorów, przedstawiłam w rozdziale 4. Pozostaje zatem kwestia celi pomiarowej, którą będzie stanowić statyw dla pary LED i kuwety z barwnym analitem, a zarazem będzie izolować układ od wpływów otoczenia. Celę wykonałam z klocków LEGO® Technics™. Trzy zasadnicze argumenty, które zadecydowały o wyborze tego właśnie rozwiązania to: dostępność, rozmiar klocków, które pozwalają na dosyć szczelne obudowanie kuwety pomiarowej. Dodatkowo, średnica otworu w klockach typu Technics™ jest kompatybilna ze średnicą ogólnie dostępnych diod (5mm), z użyciem klocków LEGO możliwe jest wprowadzanie dowolnych, szybkich zmian w konstrukcji.

8.1 Badania wstępne

Wstępne badania mające na celu wykazywanie użyteczności diod elektroluminescencyjnych jako fotowoltaicznego detektora promieniowania w pomiarach fotometrycznych, przeprowadziłam z zastosowaniem błękitu bromotymolowego (BBT).

Błękit bromotymolowy czyli dibromotymolosulfoftaleina to dwubarwny wskaźnik alkacymetryczny. W środowisku kwaśnym ($\text{pH} < 6$) przyjmuje barwę żółtą, w obojętnym zieloną a w zasadowym, powyżej $\text{pH } 7,6$, niebieską. Ponieważ niebieska forma błękitu bromotymolowego wymaga zasadowego środowiska, roztwór wzorcowy o stężeniu 50ppm sporządziłam rozpuszczając krystaliczny błękit bromotymolowy w 0,01M czteroboranie sodu o pH ok 9,2. Ten sam roztwór buforowy wykorzystałam do przygotowania roztworów wzorcowych o niższych stężeniach w zakresie 5- 50ppm.

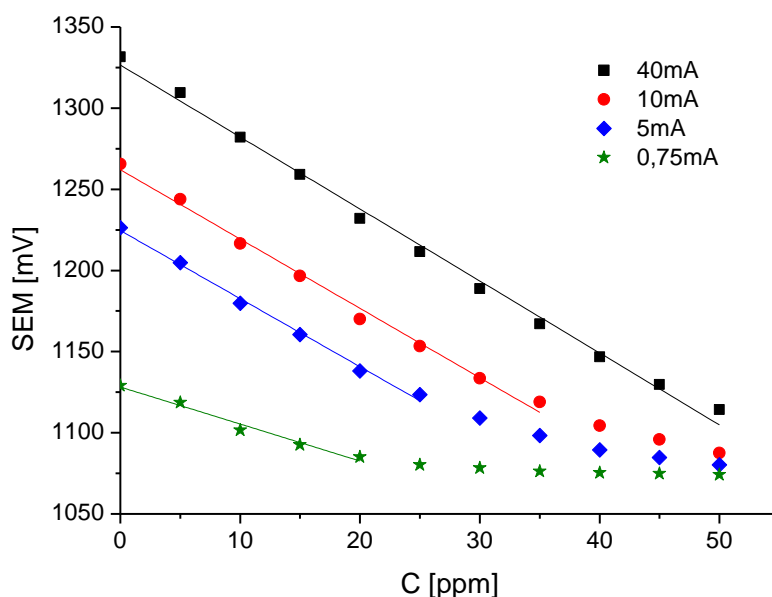
Ze względu na intensywne zabarwienie ($\epsilon = 3,0 \times 10^4 [\text{mol} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{dm}^{-3}]$), związek ten świetnie sprawdza się jako modelowy analit do pomiarów fotometrycznych. Maksimum absorpcji formy niebieskiej przypada na 616nm, co jak widać na rysunku 8.1 odpowiada zakresowi emisji czerwonej diody elektroluminescencyjnej. Do badań użyłam czerwonej LED o $\lambda_{\text{max}} - 630\text{nm}$, światłość- 1,5Cd, i kącie świecenia- 140° (OSHR53E1A-LM).



Rysunek 8.1 Widmo absorpcji i emisji czerwonej LED oraz widmo absorpcji kwaśnej i zasadowej formy BBT.

Zbudowany przeze mnie fotometr, dedykowany do oznaczeń BBT, składał się z przedstawionej wcześniej celi pomiarowej, dwóch identycznych czerwonych diod elektroluminescencyjnych, pełniących funkcję źródła i detektora promieniowania oraz rejestratora. Wstępnie zdecydowałam się mierzyć sygnał za pomocą pH metru, ponieważ pomiar siły elektromotorycznej powinien lepiej obrazować zjawiska zachodzące na złączu. Aby określić optymalne parametry pomiarów dla układu LED-LED, zarejestrowałam krzywe dla czterech różnych prądów zasilania: 0,75; 5; 10 i 40mA. Prądy te wybrałam na podstawie krzywych z wykresu 7.10 dobierając wartości z poszczególnych obszarów krzywej: szybkiego wzrostu, zagięcia i „plateau”. Wyniki przeprowadzonych pomiarów przedstawiam na rysunku 8.2

Na podstawie drugiego prawa absorpcji, można by oczekiwać, że otrzymana zależność będzie miała charakter logarytmiczny. Jednak, wygenerowana na detektorze siła elektromotoryczna jest, przynajmniej w pewnych zakresach, liniową funkcją stężenia analitu. Ponadto widać, że ze wzrostem prądu płynącego przez emiter, a co za tym idzie, ze wzrostem intensywności oświetlenia, poszerza się zakres prostoliniowego charakteru zależności. W przypadku wysokich wartości absorbancji przy niewielkich natężeniach promieniowania, wiązka zostaje prawie całkowicie pochłonięta i do detektora dociera zbyt mała ilość światła by spowodować znaczące zmiany sygnału. Stąd widoczne na wykresach charakterystyczne wygięcie świadczące o przekroczeniu możliwości detekcyjnych LED.



Rysunek 8.2 Zależność SEM detektora od stężenia BBT przy czterech różnych prądach zasilania emitera.

Te wstępne dane pokazujące kształt zależności sygnału analitycznego od stężenia pozwoliły na opracowanie teoretycznego modelu działania fotometru typu PEDD.

Prostoliniową zależność stężenia od siły elektromotorycznej wygenerowanej na złączu detektora można łatwo wyjaśnić. Jeżeli przyrzeć się bliżej przedstawionemu w poprzednim rozdziale na rysunku 7.10 wykresowi zależności siły elektromotorycznej generowanej na detektorze od natężenia prądu mierzonego na emiterze, można zauważyć analogię z krzywą prądowo - napięciową diody. Zależność ta przy zastosowaniu skali logarytmicznej przyjmuje liniowy charakter. Należy się więc odnieść do równania Shockley'a [8]:

$$i = i_s \left(e^{\frac{E}{nE_T}} - 1 \right)$$

Jeżeli napięcie na diodzie jest większe niż wartości potencjału elektrochemicznego, który w temperaturze pokojowej nie przekracza 25mV, równanie można uprościć do postaci [8]:

$$i = i_s e^{\frac{E}{nE_T}}$$

a ponieważ interesuje nas napięcie, można dokonać przekształcenia do postaci:

$$E = nE_T (\ln i - \ln i_s)$$

Parametry E_T czyli potencjał elektrochemiczny, którego wartość w temperaturze pokojowej to ok 25mV) i i_s (prąd nasycenia złącza) można uznać za stałe w warunkach pomiaru, co umożliwia dalsze uproszczenie zależności do postaci:

$$E = a + b \log i$$

gdzie:

$$a = nE_T \ln i_S \quad \text{zaś} \quad b = 2,3025 \times nE_T$$

Z drugiej strony, dla małych prądów natężenie emitowanego przez diodę światła jest wprost proporcjonalne do natężenia płynącego przez nią prądu i odwrotnie - natężenie wygenerowanego na diodzie prądu jest wprost proporcjonalne do natężenia padającego na nią promieniowania. Opisuje to zależność:

$$I = \frac{\eta h \nu}{e \Omega} i$$

Łącząc te dwie zależności otrzymujemy równanie w j postaci :

$$E = a + B \log I$$

gdzie:

$$a = nE_T \ln i_S \quad \text{zaś} \quad B = 2,3025 \times nE_T \log\left(\frac{\Omega e}{\eta h \nu}\right)$$

W przypadku opisywanego urządzenia PEDD podobnie jak we wszystkich pomiarach optycznych, najpierw wyznacza się wartość napięcia na detektorze dla roztworu bez substancji absorbującej czyli sygnał analityczny dla tzw. ślepej próby E_{BLANK} :

$$E_{BLANK} = a + B \log I_{BLANK}$$

a następnie dla badanej próbki:

$$E_{SAMPLE} = a + B \log I_{SAMPLE}$$

Różnica tych sygnałów będzie wynosić:

$$\Delta E = E_{BLANK} - E_{SAMPLE} = (a + B \log I_{BLANK}) - (a + B \log I_{SAMPLE}) = B \log \frac{I_{BLANK}}{I_{SAMPLE}}$$

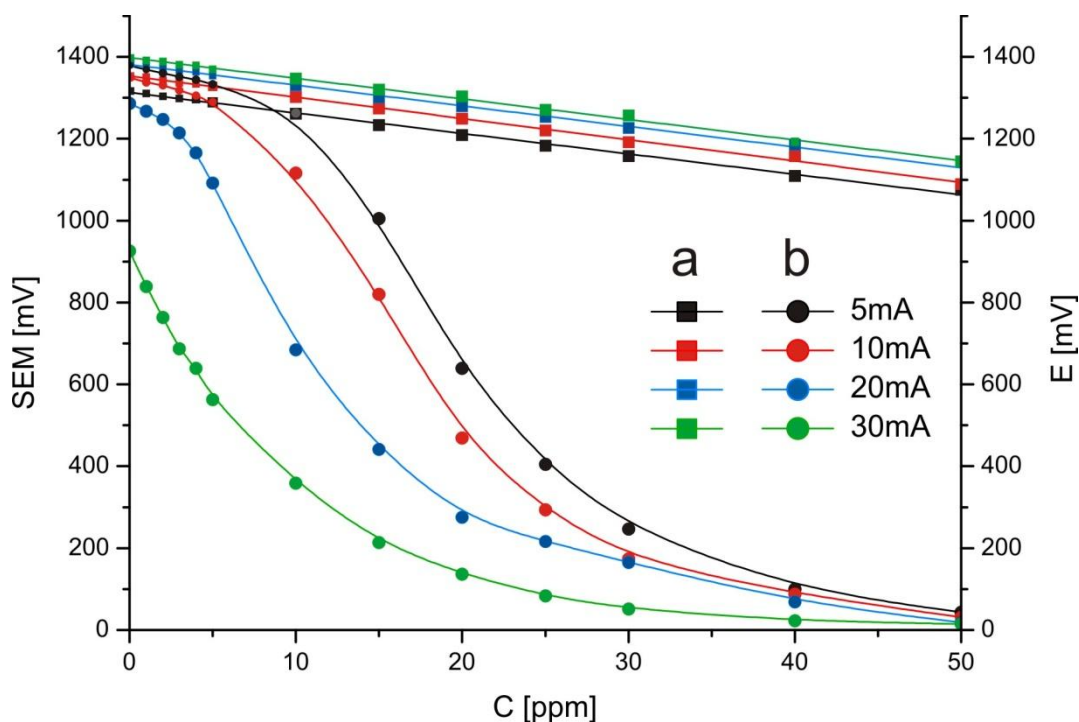
Logarytm ilorazu natężenia promieniowania dla ślepej próby i natężenie promieniowania po przejściu przez próbkę to elementarna definicja absorbancji (Abs), stąd:

$$\Delta E = B \log \frac{I_{BLANK}}{I_{SAMPLE}} = B \times Abs_{SAMPLE} = B \times \varepsilon \times l \times C$$

Powyższa zależność, będąca prostą kombinacją równania Shockley'a i prawa Lamberta-Beera, wskazuje, że modelowy sygnał potencjałowy generowany przez detektor typu PEDD jest wprost proporcjonalny do stężenia analitu. Stała B w tym równaniu jest parametrem aparaturowym opisującym czułość danego detektora.

Inaczej będą się przedstawiać wyniki badań prowadzonych z użyciem woltomierza. Zwykły woltomierz, jako urządzenie niskooporowe, nie umożliwia pomiarów w warunkach

bezprądowych, stąd też mierzony sygnał może być niższy ze względu na zmienną oporność wewnętrzną diody detektora.



Rysunek 8.3 Krzywe kalibracyjne BTB zarejestrowane za pomocą a- pH-metru i b- multimetru przy czterech różnych prądach zasilania źródła.

Ponieważ, zgodnie z równaniem Shockley'a będzie ona miała charakter wykładniczy, można się spodziewać, że zależność napięcia na diodzie od stężenia analitu będzie miała inny kształt niż miało to miejsce w przypadku użycia wysokooporowego miernika. Na rysunku 8.3 widać krzywe kalibracyjne zarejestrowane dla serii wzorców, za pomocą pH-metru i multimetru.

Jak łatwo zaobserwować, dla dużych stężeń napięcie na detektorze spada praktycznie do zera. Wymuszony niską opornością miernika przepływ prądu przez diodę i ruch nośników większościowych poszczególnych półprzewodników niweluje różnicę potencjałów na złączu. Dzięki temu zjawisku można otrzymać krzywe kalibracyjne o znacznie większej czułości niż w przypadku pomiarów SEM. Z drugiej strony przepływ prądu przez złącze wymusza wprowadzenie do przedstawionej wcześniej zależności, członu uwzględniającego zmienną oporność wewnętrzną diody, która jest funkcją płynącego przez nią prądu. Powoduje to, że otrzymane za pomocą woltomierza krzywe, nie wykazują prostoliniowego charakteru w całym zakresie badanych stężeń. Jednak, zmieniając prąd zasilania, a tym samym intensywność emisji źródła, można wpływać na kształt krzywych

kalibracyjnych. Dzięki temu można tak ustalić warunki prądowe aby otrzymana zależność napięcia od stężenia charakteryzowała się dość szerokim zakresem bezpośredniej proporcjonalności i dużą czułością.

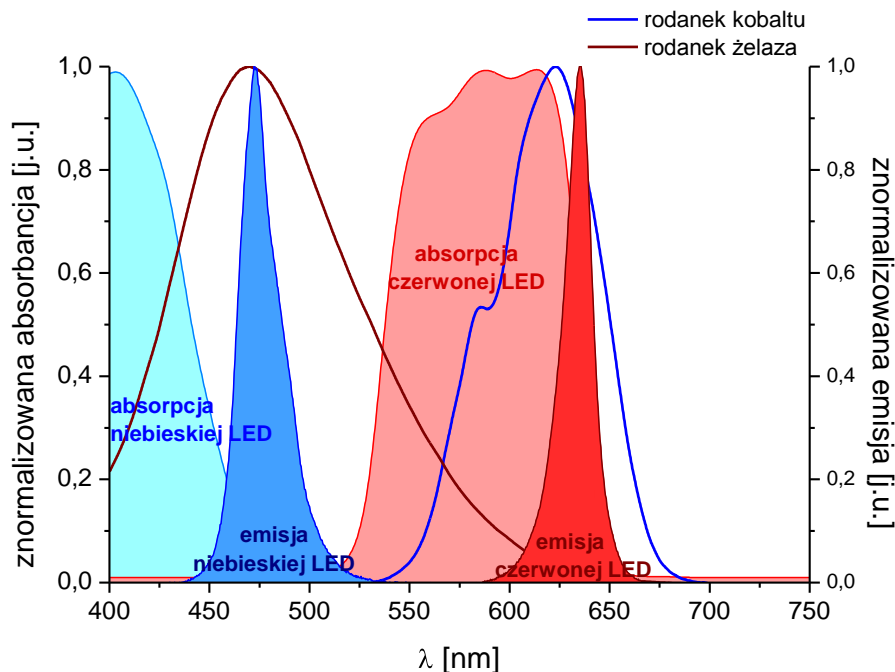
Podsumowując, proponowany detektor PEDD generuje sygnał napięciowy wprost proporcjonalny do stężenia analitu. Sygnał ten można mierzyć zarówno wysokooporowym pH-metrem jak i znacznie prostszym multimetrem uzyskując szeroki zakres prostoliniowej charakterystyki analitycznej bądź znacząco zwiększoną czułość w wąskim zakresie, co dodatkowo podnosi atrakcyjność tego rozwiązania.

8.2 Oznaczanie kobaltu i żelaza(III)

W ramach kolejnego eksperymentu postanowiłam sprawdzić selektywność fotometru PEDD. Do przeprowadzenia tych testów wybrałam prostą reakcję otrzymywania różnobarwnych kompleksów rodankowych kobaltu i żelaza(III). Procedurę analityczną zaczerpnęłam z opracowania monograficznego Z. Marczenko [69].

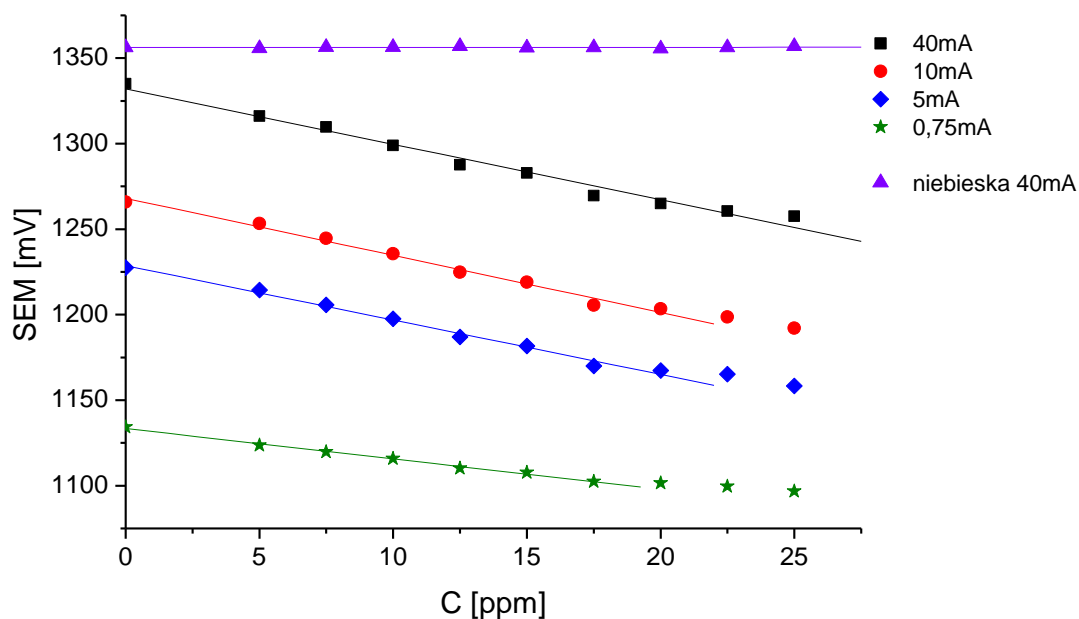
Istotnymi czynnikami decydującymi o czułości metody są stężenie jonów SCN^- , (wpływające na stopień skompleksowania jonów), odpowiednie pH (zapobiegające hydrolizie kompleksu) oraz obecność rozpuszczalników o mniejszej stałej dielektrycznej niż woda (które promują tworzenie kompleksów z większą liczbą ligandów a w konsekwencji intensywności zabarwienia) zwiększa trwałość kompleksów kobaltu i intensywność barwy kompleksu żelaza. W optymalnych warunkach odczynnik kompleksujący zawierał 25% wagowych rodanku potasu, 25% wody i 50% acetonu. Wzorce jonów metali przygotowane w 0,1M kwasie azotowym mieszane były z odczynnikiem w stosunku 1:4. Ze względu na dużą lotność acetonu i jego istotny wpływ na intensywność zabarwienia kompleksów kobaltu, a także powolną samoistną redukcję jonów Fe^{3+} w obecności rodanków wszystkie pomiary należało przeprowadzić w stałym interwale czasowym. Przygotowane roztwory wzorcowe zawierały jony żelaza(III) w przedziale od 1 do 5ppm i kobaltu od 5 do 25ppm.

Na rysunku 8.4 pokazano widma absorpcji obu kompleksów oraz zakresy absorpcji i emisji diod zastosowanych w eksperymencie diod. Do oznaczeń niebieskiego kompleksu kobaltu zastosowałam zestaw czerwony emiter i czerwony detektor, identyczny jak w przypadku oznaczeń BBT. Do oznaczeń czerwonego rodanku żelaza użyłam układu z niebieskim emiterem (λ_{max} - 470nm, światłość- 0,5Cd, kąt świecenia 140°).



Rysunek 8.4 Widma absorpcji i emisji czerwonej i niebieskiej LED oraz widma absorpcji rodanek kobaltu i żelaza.

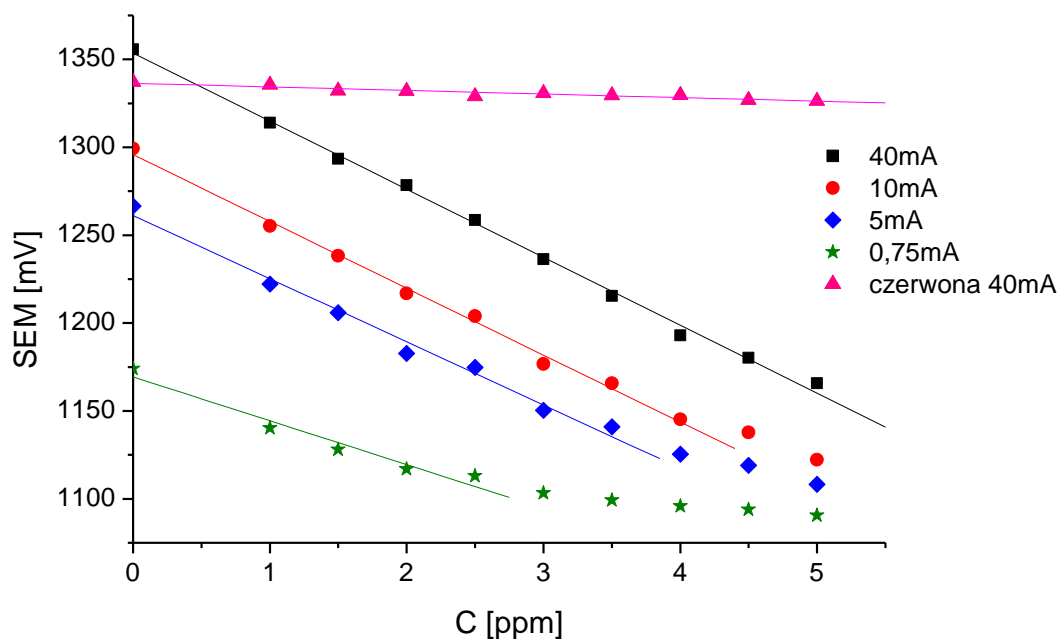
Co prawda zakresy czułości spektralnych obu LED tylko nieznacznie pokrywają się z widmem emisji niebieskiej LED, jednak w toku eksperymentu okazały się wystarczające do wygenerowania zadowalających sygnałów analitycznych i dlatego oba detektory zastosowałam do oznaczeń jonów żelaza.



Rysunek 8.5 Zależności SEM od stężenia jonów żelaza dla czterech różnych prądów zasilania niebieskiego emitera oraz przy zastosowaniu niekorelującego z widmem absorpcji emitera niebieskiego.

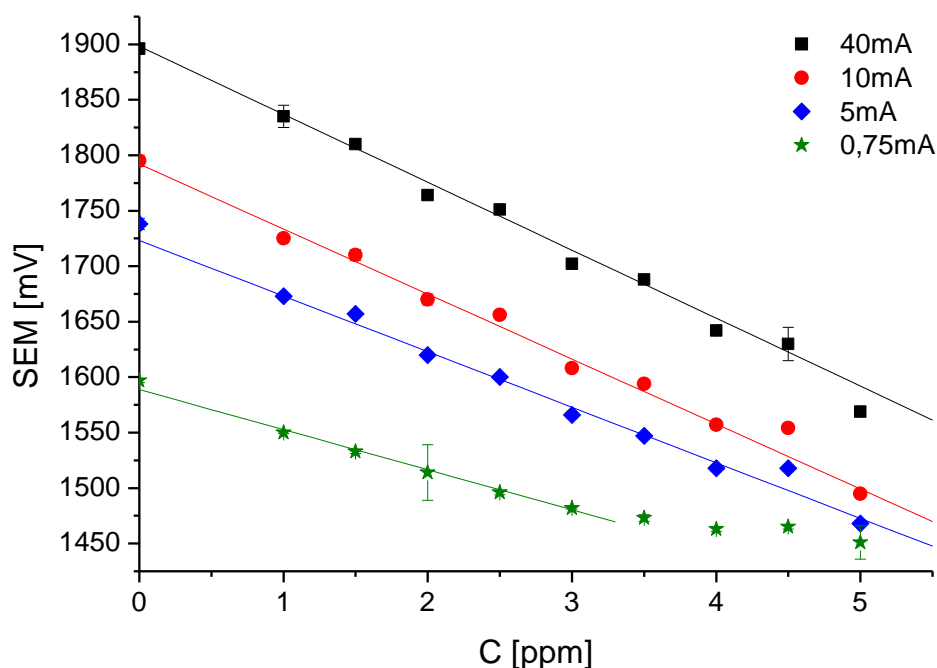
Sygnały analityczne zarejestrowałam za pomocą pH-metru, dla czterech wartości prądów zasilania emitera: 0,75; 5; 10 i 40mA. Dodatkowo sprawdziłam czy czerwony emiter LED przy oznaczeniach żelaza(III) i niebieski przy oznaczeniach kobaltu, również będą generować zależny od stężenia analitu sygnał na uniwersalnym czerwonym detektorze (rys. 8.5 i 8.6).

Roztwory kompleksów rodankowych kobaltu nie były intensywnie zabarwione i zapewne z tego powodu wszystkie krzywe w całym zakresie stężeń zachowują swój prostoliniowy charakter (rys. 8.5). Prawdopodobnie również z powodu mniej intensywnego zabarwienia kompleksów kobaltu w tym przypadku nie występują tak duże rozbieżności czułości dla poszczególnych wartości prądu zasilania diody emitera.



Rysunek 8.6 Zależność SEM czerwonego detektora od stężenia jonów żelaza dla czterech różnych prądów zasilania niebieskiego emitera oraz przy zastosowaniu niekorelującego z widmem absorpcji emitera czerwonego.

Jak pokazano na rysunku 8.6 nawet w przypadku szczątkowej korelacji czułości spektralnej diody detektora z zakresem emisji źródła (jak ma to miejsce w przypadku kombinacji niebieski emiter czerwony detektor) można otrzymać wysokie wartości sygnału potencjałowego. Niebieski LED jako detektor (rys 8.7), zgodnie z przewidywaniami, pozwala, na osiągnięcie prawie dwukrotnie większej czułości, jednak zarejestrowane za jego pomocą wartości obarczone są większym błędem (dla niebieskiego detektora średnia wartość RSD=3,65mV dla czerwonego RSD=1,52mV).



Rysunek 8.7 Zależność SEM niebieskiego detektora od stężenia jonów żelaza dla czterech różnych prądów zasilania niebieskiego emitera.

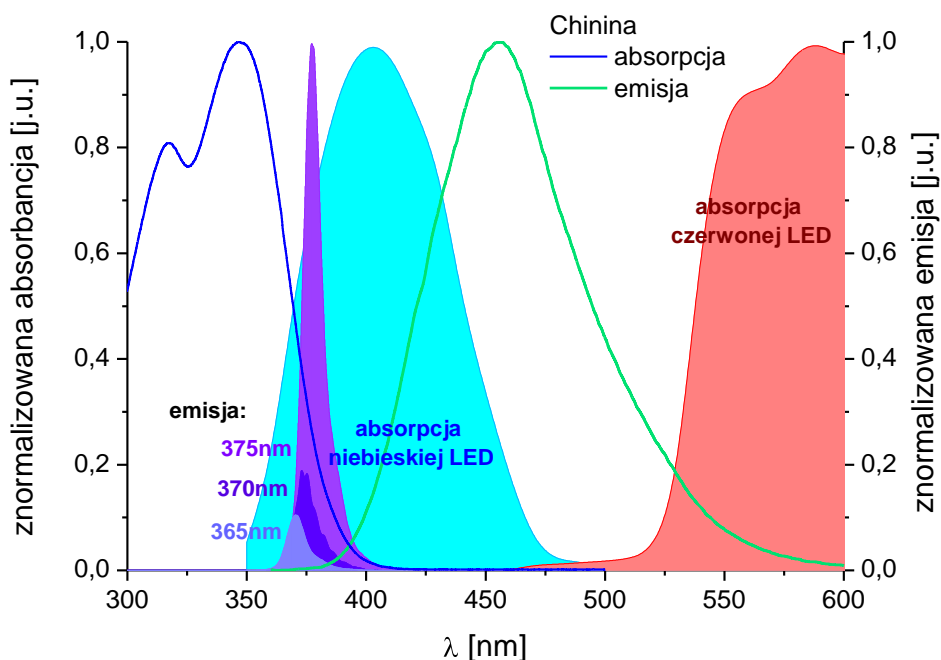
Ponieważ kompleksy rodanków żelaza(III) mają znacznie bardziej intensywną barwę a co za tym idzie znacznie silniej absorbują promieniowanie elektromagnetyczne (w podanych warunkach $\epsilon_{(475\text{nm})}=2,2 \times 10^4 \text{ mol cm}^{-1} \text{ dm}^{-3}$), na krzywych rejestrowanych dla małych intensywności emisji promieniowania źródła, szczególnie w przypadku czerwonego detektora (rys. 8.7), widoczny jest ograniczony zakres prostoliniowości w zależności napięcie na detektorze – stężenie analitu. W związku z tym zmniejsza się zakres oznaczalności układu.

Zarówno w oznaczeniach jonów kobaltu jak i żelaza test selektywności wypadł pomyślnie. Przy zastosowaniu nieodpowiedniego detektora układ nie zareagował zmianami napięcia na detektorze na zmiany stężenia analitu. Potwierdziły to także eksperymenty przeprowadzone w warunkach przepływowych, które przedstawiłam w dalszej części pracy (rozdział 10).

8.3 Oznaczanie chininy

Chinina jest modelową substancją fluoryzującą, bardzo często wykorzystywaną w pokazowych doświadczeniach [70]. Można ją oznaczać zarówno fotometrycznie jak i fluorymetrycznie. Jednak jej fotometryczna detekcja w pewnych sytuacjach może być problematyczna, ponieważ do detektora docierać będzie promieniowanie emitowane zarówno przez źródło jak i analit. A zatem powinien on wykazywać się dobrą selektywnością spektralną.

Aby odpowiednio przeprowadzić tego typu test selektywności należy przeanalizować dwie sytuacje: pomiar fotometryczny przy intensywnej fluorescencji oraz przy jej wygaszeniu. Chinina intensywnie fluoryzuje w środowisku 0,05M kwasu siarkowego(VI), natomiast dodatek anionów chlorkowych powoduje wygaszenie fluorescencji. Stąd też do oznaczeń przygotowałam 2 serie wzorców, o stężeniach: 0,2; 0,5; 1; 2; 5; 10; 20; 50; 100µM, w 0,05M H₂SO₄ z i bez dodatku jonów chlorkowych (w postaci NaCl) o finalnym stężeniu 1M.

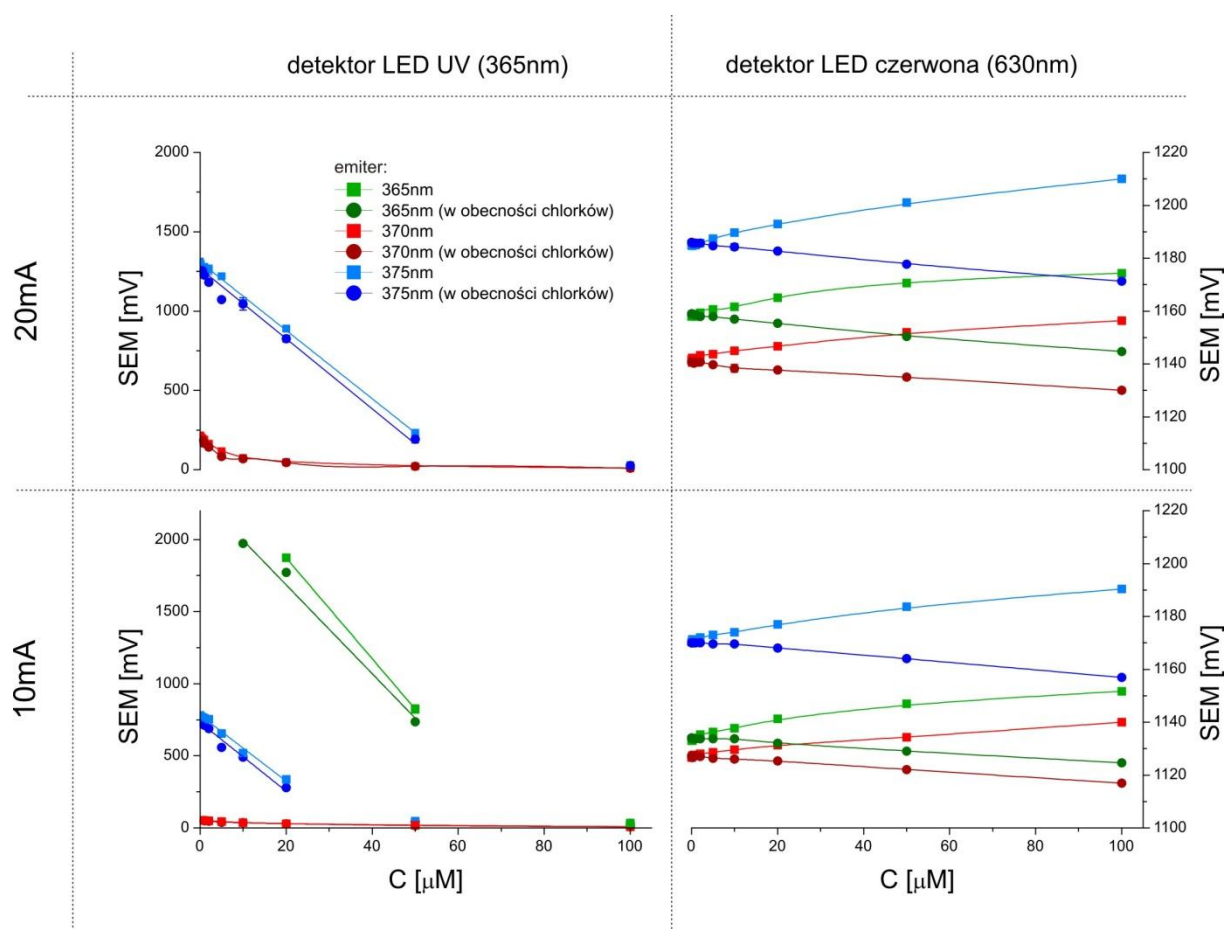


Rysunek 8.8 Widma absorpcji i emisji chininy zestawione widmami emisji trzech potencjalnych emiterów oraz widmami absorpcji czerwonej i niebieskiej LED.

Ponieważ chinina absorbuje promieniowanie w zakresie bliskiego nadfioletu, a jej maksimum absorpcji przypada przy długości fali 350nm, jako potencjalne źródło promieniowania sprawdziłam trzy dostępne diody UV: 365nm (o mocy 3mW); 370nm (6mW)

oraz 375nm (11mW) (rys 8.8). Te same diody, razem z czerwoną i niebieską LED zostały przetestowane w funkcji detektora, zaś jako rejestrator sygnału wstępnie zastosowałam pH-metr. Krzywe kalibracyjne wykonałam dla dwóch wartości prądu zasilania źródła: 10 i 20mA. Ponieważ diody UV są dosyć słabymi emiterami, nie było zasadnym przykładać prądu mniejszego niż 10mA, natomiast prądy wyższe niż 20mA nieodwracalnie uszkadzały złącze diody.

Wykres na rysunku 8.9 przedstawia krzywe kalibracyjne zarejestrowane dla różnych kombinacji emiter - detektor. Przetestowałam wszystkie możliwe warianty detektorów, jednak wygenerowany na diodach niebieskiej oraz UV 370 i 375nm sygnał przekraczał górną granicę skali pH-metru (2,0V) w całym badanym zakresie stężeń. Nawet w przypadku detektora 365nm nie udało się zarejestrować sygnałów dla wszystkich zakładanych kombinacji emiter-detektor w pełnych zakresach. Mimo to zależności uzyskane dla tych dwóch detektorów LED bardzo dobrze obrazują ich selektywność.

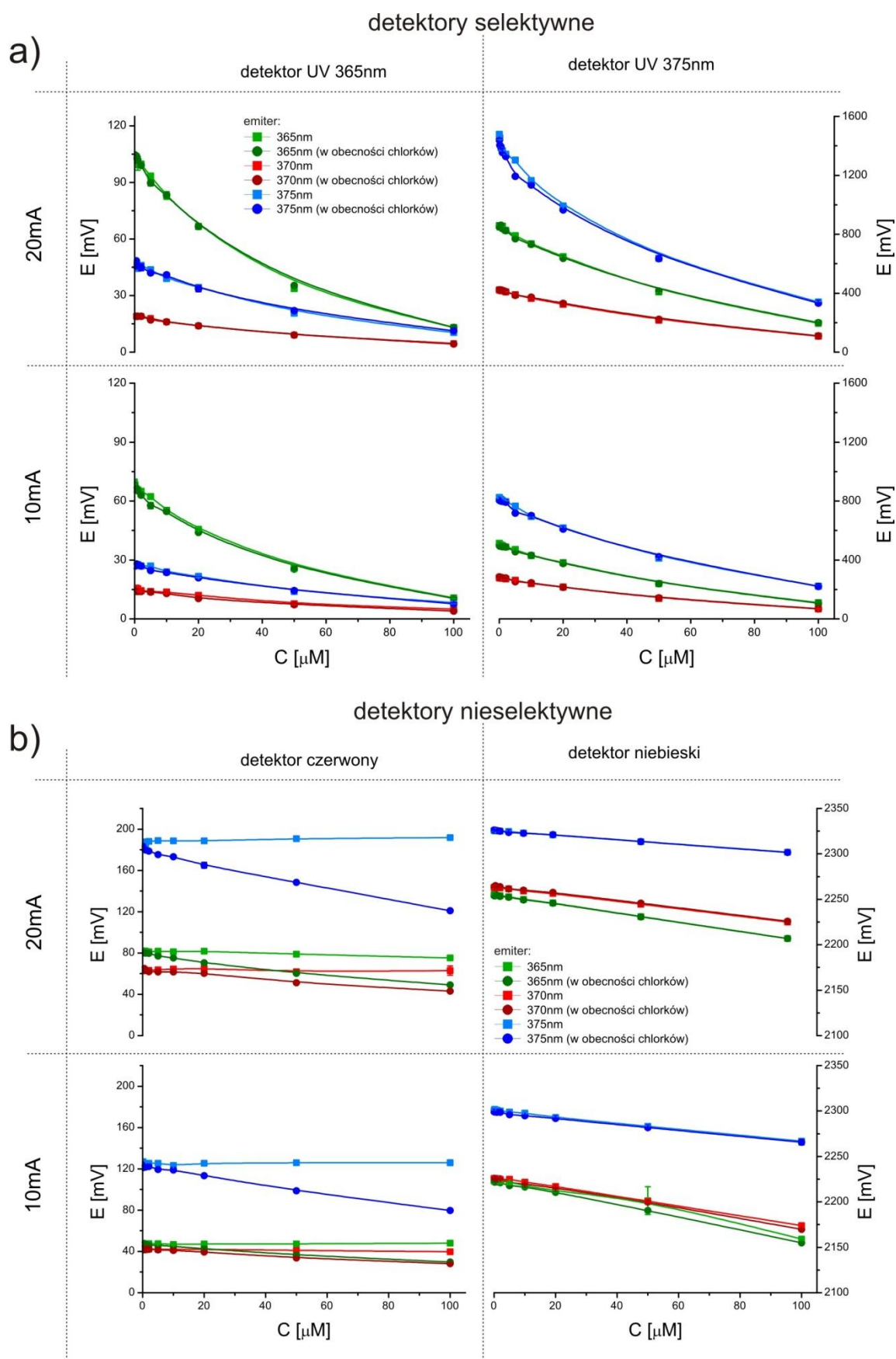


Rysunek 8.9 Fotometryczne krzywe kalibracyjne chininy fluoryzującej i wygaszonej otrzymane przy użyciu różnych kombinacji źródła detektora i prądów zasilania.

W przypadku detektora UV nie widać znaczącej różnicy między krzywymi kalibracyjnymi zarejestrowanymi dla wzorców fluoryzujących i wygaszonych. W pomiarach z zastosowaniem czerwonego detektora widać natomiast inwersję krzywych kalibracyjnych otrzymanych przy użyciu wzorców bez dodatku NaCl. Sygnał analityczny zamiast maleć - rośnie wraz ze stężeniem analitu. Wynika to ze wzrostu intensywności fluorescencji dla kolejnych wzorców, a jak pokazano na rysunku 8.8 czerwona LED jest bardziej czuła na niebieskie promieniowanie emitowane przez próbkę, niż na fioletowe światło emitera. Co za tym idzie czerwony detektor nie nadaje się do fotometrycznego oznaczania chininy. Wyniki te jednak pozwalają przypuszczać, że z jego pomocą można prowadzić fluorymetryczne oznaczenia chininy.

Ze względu na ograniczony zakres pomiarowy pH-metru, identyczne pomiary przeprowadziłam używając do rejestracji sygnału multimetru. W tym eksperymencie udało się zarejestrować sygnały dla wszystkich badanych detektorów. Jak pokazano na rysunku 8.10, podobnie jak we wcześniejszych oznaczeniach, multimetr nie rejestruje tak wysokich sygnałów jak pH-metr. Napięcie zarejestrowane na detektorze czerwonym i UV emitującym przy 365nm, jest ponad dziesięć razy mniejsze niż analogicznie zarejestrowana siła elektromotoryczna (rys. 8.9).

Ten eksperyment również dowodzi selektywności detektorów LED. Podobnie jak przy pomiarach SEM, napięcie zarejestrowane na detektorach UV LED dla próbek fluoryzujących jak i niefluoryzujących nie różni się znacząco. W przypadku czerwonego detektora, widać znaczącą różnicę w krzywych kalibracyjnych sporządzonych dla wzorców z i bez dodatku NaCl. W przypadku roztworów fluoryzujących nachylenie krzywej kalibracyjnej praktycznie nie ulega zmianie, można więc podejrzewać, że efekty od rosnącej absorbancji i fluorescencji wzajemnie się wykluczają. Nie można natomiast jednoznacznie określić selektywności bądź jej braku w przypadku niebieskiego detektora. Co prawda krzywe kalibracyjne wzorców fluoryzujących i niefluoryzujących częściowo się pokrywają jednak bardzo wysoki sygnał dla ślepej próby (2220- 2330mV), tylko nieznacznie spada (o 12 do 57mV).



Rysunek 8.10 Krzywe kalibracyjne chininy zarejestrowane za pomocą multimetru dla różnych wariantów emiterów i detektorów a- selektywnych, nie czułych na promieniowanie fluorescencyjne, oraz b- nioselektywnych.

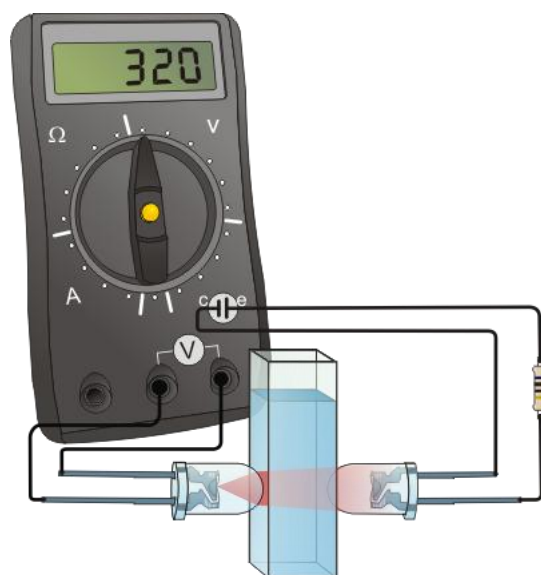
Detektor PEDD, składający się z pary diod UV (emiter 375nm i detektor 365nm) zastosowałam do oznaczenia chininy w próbkach rzeczywistych. Przepadałam cztery rodzaje toników. Ponieważ producenci nie mają obowiązku informować o zawartości chininy w napojach, w celu określenia jej stężenia przeprowadziłam fotometryczne pomiary referencyjne z użyciem standardowego spektrofotometru (Shimadzu UV-2401 PC). W zależności od potrzeb, próbki były nierozcieńczone lub rozcieńczone pięciokrotnie. Wyniki oznaczeń fotometrem PEDD (tabela 8.1) wykazywały dużą zgodność z metodą referencyjną. Dzięki dużej selektywności diody elektroluminescencyjnej jako detektora, można prowadzić skuteczne oznaczenia fotometryczne fluoryzujących substancji bez konieczności użycia dodatkowych komponentów optycznych takich jak monochromatory czy filtry.

Tabela 8.1 Wyniki oznaczeń chininy w próbkach rzeczywistych (napoje).

Próbka	Pomiar referencyjny [μM]	Pomiar fotometrem PEDD [μM]
Kinley	99 \pm 2	100 \pm 3
Zbyszko	50 \pm 1	50 \pm 2
Schweepes	110 \pm 1	110 \pm 2
Ustronianka	35 \pm 1	36 \pm 1

8.4 Fotometr PEDD do celów edukacyjnych

W poprzednich rozdziałach wykazałam, że użyteczny sygnał analityczny wygenerowany na diodzie elektroluminescencyjnej, pracującej w funkcji detektora promieniowania, można mierzyć zarówno pH-metrem jak i konwencjonalnym woltomierzem. Przedstawiony przeze mnie fotometr typu PEDD jest i tak rozwiązaniem znacznie prostszym niż ten proponowany przez grupę z D.C.U. (rozdział 4.2) jednak urządzenie to można uprościć jeszcze bardziej.

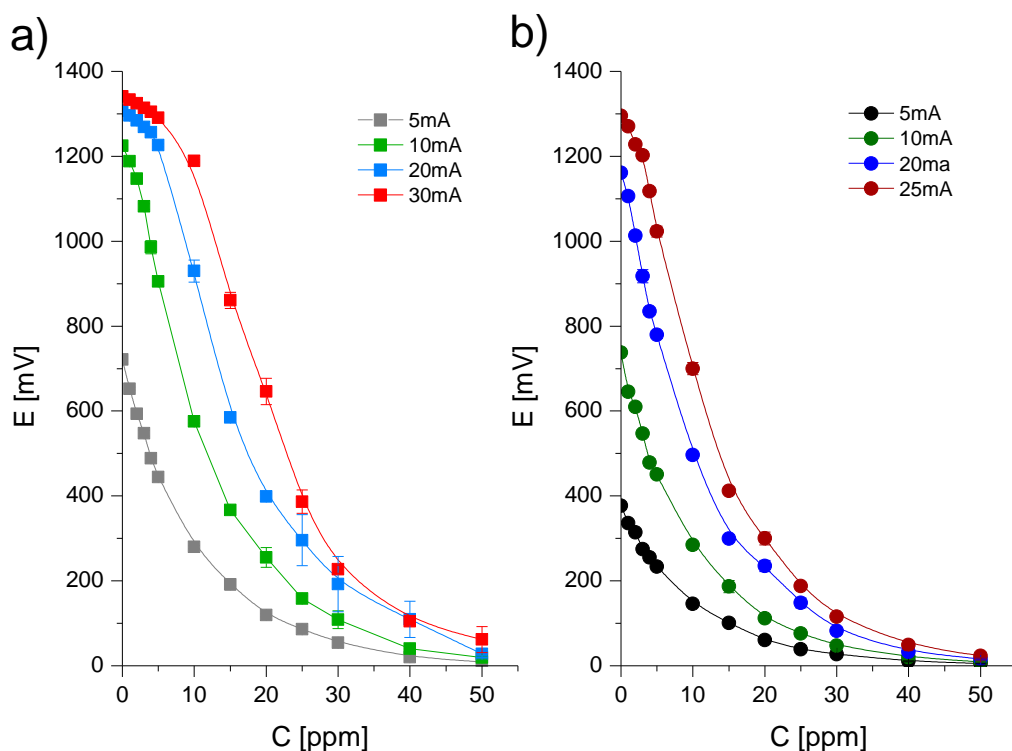


Rysunek 8.11 Schemat fotometru PEDD.

Niektóre multimetry (np. Unit UT30C) wyposażone są w specjalne gniazdo przeznaczone do testowania tranzystorów. Gniazdo to można wykorzystać jako potencjalne źródło zasilania emitera. Tym samym można ograniczyć układ pomiarowy wyłącznie do celi pomiarowej, dwóch diod elektroluminescencyjnych i prostego multimetru (rys 8.11). Są jednak pewne ograniczenia, mianowicie napięcie wyjściowe testera diod nie przekracza 1,5V w związku z czym fotometr będzie współpracował wyłącznie z czerwonym emiterem a co za tym idzie również z czerwonym detektorem. Nie daje to szerokich możliwości analitycznych ale jest wystarczające do celów edukacyjnych

Prawidłowe działanie tego typu rozwiązania potwierdziłam rejestrując serię krzywych kalibracyjnych dla błękitu bromotymolowego. Pomiary wykonywałam przy użyciu tego samego multimetru (model UT30C), w dwóch wariantach zasilania emitera: zewnętrznym źródłem (rys. 8.12 a) oraz z gniazda multimetru (rys 8.12 b).

Niższe, w porównaniu do zewnętrznego źródła, napięcie wyjściowe na multimetrze powodowało, że przy tych samych natężeniach prądu zasilania widać niewielką różnicę w intensywności promieniowania emitera. Porównując krzywe dla 10 i 20mA na wykresie „a” do krzywych dla 5 i 10mA na wykresie „b”, można przypuszczać, że intensywność emisji przy zasilaniu z miernika będzie dwukrotnie mniejsza niż przy zewnętrznym zasilaniu. Mimo to proponowany układ nadal jest użyteczny analitycznie.

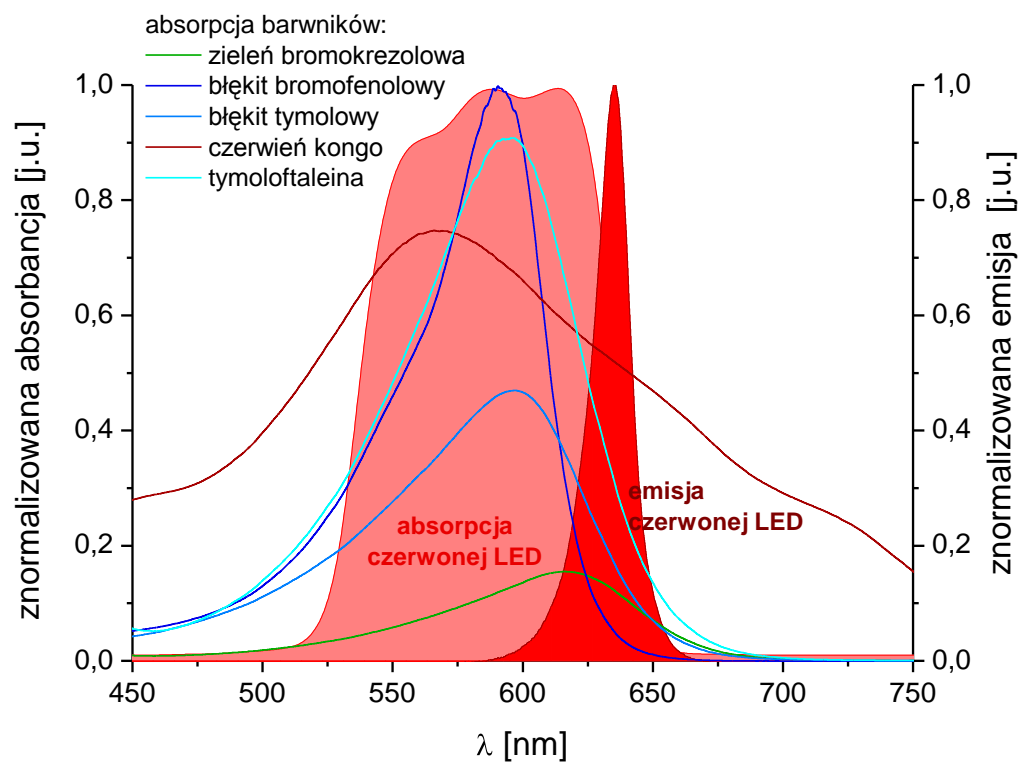


Rysunek 8.12 Krzywe kalibracyjne BTB zarejestrowane tym samym miernikiem przy zasilaniu :a- zewnętrznym, b- z gniazda multimetru.

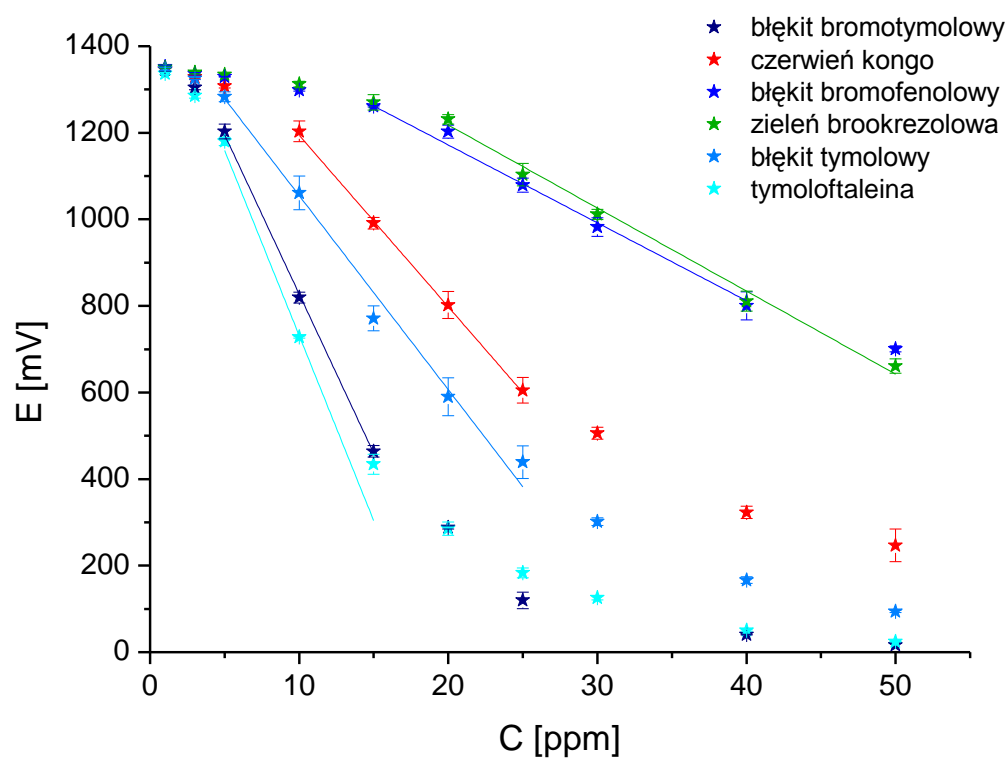
8.4.1 Oznaczanie wybranych barwników

Jako potencjalne anality wybrałam wskaźniki kwasowo zasadowe, których jedna z form przyjmuje niebieską barwę: czerwień Kongo (CK), błękit bromofenolowy (BBF), zielen bromokrezolową (ZBK), błękit tymolowy (BT), tymoloftaleinę (TF) oraz użyty we wcześniejszych oznaczeniach błękit bromotymolowy (BBT). Jak widać na rysunkach 8.1 i 8.13 widma absorbcyjne niebieskich form tych wskaźników dosyć dobrze pokrywają się z zakresem emisji i absorpcji czerwonej diody elektroluminescencyjnej a więc nadają się do demonstracji pomiarów fotometrycznych urządzeniem typu PEDD.

Ze względu na różne właściwości kwasowo- zasadowe wybranych barwników konieczny był odpowiedni dobór środowiska reakcji. Roztwory wzorcowe, o stężeniach od 0 do 50ppm, błękitu bromotymolowego, bromofenolowego i zieleni bromokrezolowej przygotowane były w 0,01M roztworze czteroboranu sodu, błękitu tymolowego i tymoloftaleiny w 0,1M wodorotlenku sodu, zaś czerwieni Kongo w 0,1M kwasie solnym. Otrzymane krzywe kalibracyjne przedstawiam na wykresie na rysunku 8.14.



Rysunek 8.13 Widma absorpcji niebieskich form barwników, oraz absorpcja i emisja czerwonej LED.



Rysunek 8.14 Krzywe kalibracyjne dla wybranych barwników sporządzone za pomocą fotometru PEDD.

Czułość oznaczeń poszczególnych barwników determinowały zwłaszcza dwa czynniki: wartość molowego współczynnika absorpcji oraz zgodność widma absorpcyjnego z emisją czerwonej diody elektroluminescencyjnej. Jak pokazano na rysunku 8.14 najmniejszą czułość otrzymałam dla zieleni bromokrezolowej i błękitu bromofenolowego. O ile jednak ZBK jest substancją o niezbyt intensywnym niebieskim zabarwieniu ($\epsilon_{(616\text{nm})}=0,017 \text{ dm}^3 \text{ cm}^{-1}\text{mol}^{-1}$) to BBF jest najintensywniej absorbującym z użytych barwników ($\epsilon_{(589\text{nm})}=0,174\text{dm}^3\text{cm}^{-1}\text{mol}^{-1}$). Jednak jak widać na rysunku 8.13 jego widmo absorpcji tylko nieznacznie pokrywa się z zakresem emisji czerwonej LED. Podobnie w przypadku krzywych o największej czułości np. tymolofaleiny. Tu powodem takiego kształtu charakterystyki jest duża wartość współczynnika absorpcji ($\epsilon_{(564\text{nm})}=0,195 \text{ dm}^3 \text{ cm}^{-1}\text{mol}^{-1}$) przy zadowalającej korelacji widm, natomiast w przypadku błękitu bromotymolowego bardzo dobre dopasowanie widm przy średnich wartościach $\epsilon_{(630\text{nm})}=0,077 \text{ dm}^3 \text{ cm}^{-1}\text{mol}^{-1}$.

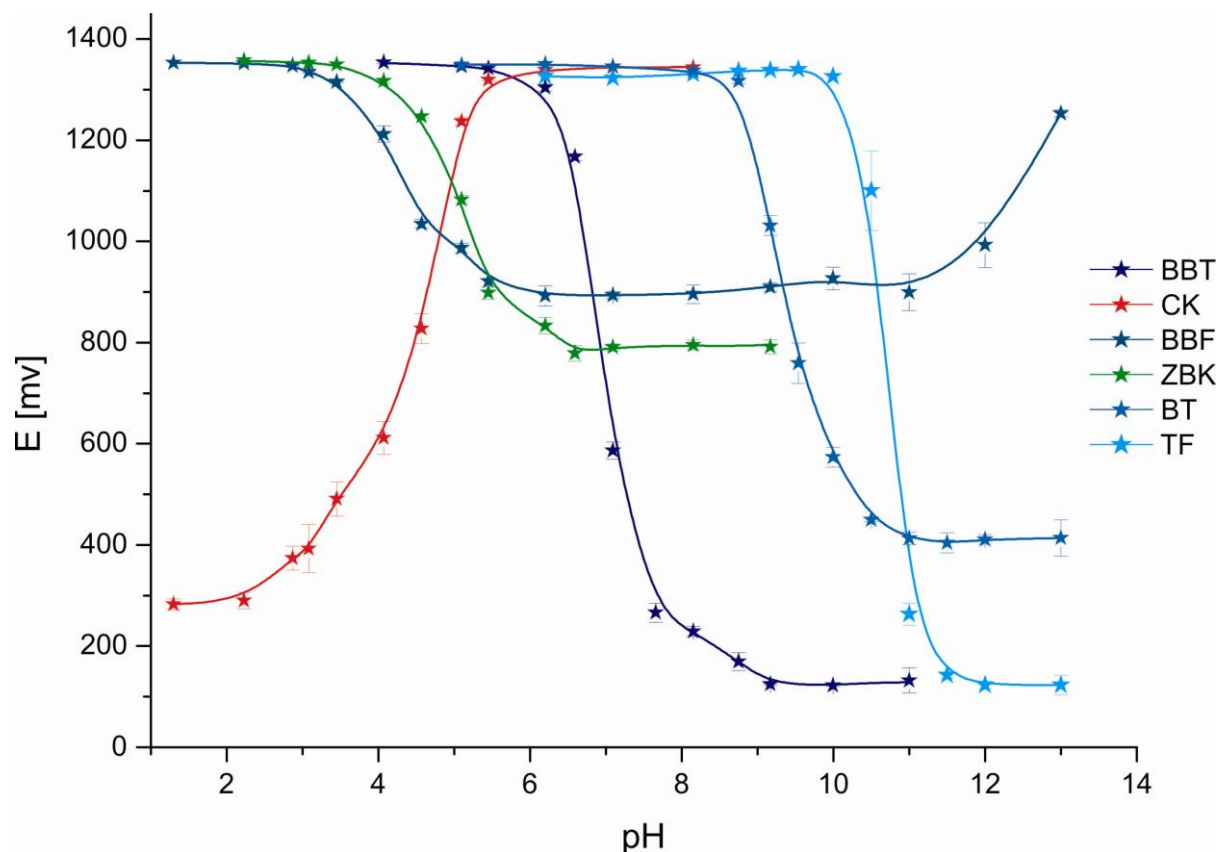
8.4.2 Wyznaczanie pKa barwników

Wszystkie badane barwniki to wskaźniki alkacymetryczne. Każdy z nich wykazuje inne wartości pKa, które zresztą można wyznaczyć monitorując zmiany stężenia niebieskiej formy wraz ze zmianami pH. Stąd też oprócz demonstracji krzywych kalibracyjnych, prezentowany fotometr edukacyjny można zastosować do wyznaczania pKa tych indykatorów metodą kolorymetryczną [71].

Do tego eksperymentu zaproponowałam bufor uniwersalny, który za pomocą stężonego kwasu solnego bądź zasady sodowej doprowadzałam do pH w zakresie od 2 do 10. Żeby zapewnić skrajnie kwaśne lub zasadowe środowisko użyłam 0,1M roztwór HCl oraz 0,1; 0,01; 0,001M NaOH. Dzięki temu dysponowałam serią próbek barwników o stężeniu 50ppm, w roztworach o pH od 1 do 13. Następnie zarejestrowałam zależności napięcia na diodzie detektorze od pH (rys. 8.15) i metodą pierwszej pochodnej wyznaczyłam pKa barwników (tab. 8.2).

Otrzymane wartości są bliskie wartościom literaturowym [72], tak więc nawet mimo dość ograniczonego zakresu prostoliniowości krzywych kalibracyjnych, nadal możliwe jest wyznaczenie stałych dysocjacji wybranych wskaźników, za pomocą fotometru PEDD. Co za tym idzie to proste urządzenie pozwala mierzyć pH i monitorować jego zmiany w wybranym

zakresie, zależnym od użytego wskaźnika. Dzięki temu istnieje możliwość zastosowania proponowanego urządzenia do pomiarów środowiskowych, bądź zaadaptowania go do bardziej złożonych pomiarów bioanalitycznych opartych właśnie na pomiarze pH.



Rysunek 8.15 Zależność napięcia na detektorze od pH dla wybranych wskaźników.

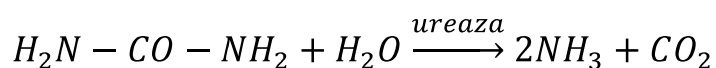
Tabela 8.2 pKa badanych barwników, literaturowe i wyznaczone fotometrem PEDD.

wskaźnik	pKa literaturowe [72]	pKa wyznaczone
		eksperymentalnie fotometrem PEDD
Błękit bromotymolowy (BBT)	7,2	7,0
Czerwień Kongo (CK)	4,0	4,2
Błękit bromofenolowy (BBF)	4,1	4,2
Zieleń bromokrezolowa (ZBK)	4,9	4,8
Błękit tymolowy (BT)	8,9	9,1
Tymoloftaleina (TF)	9,7	10,0

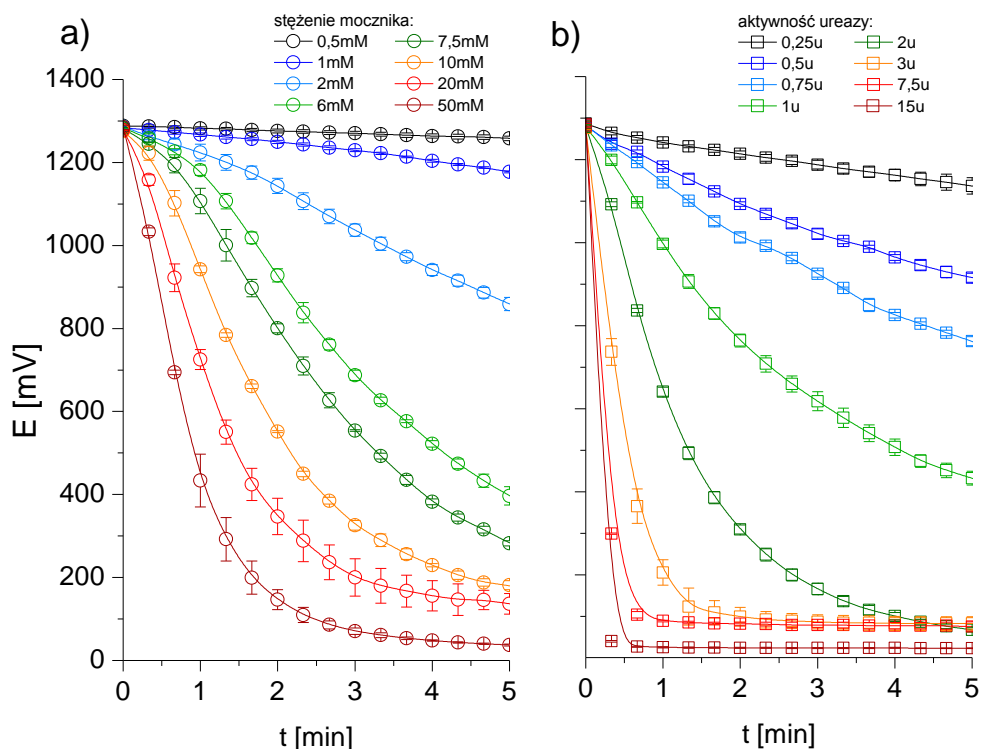
8.4.3 Pomiary bioanalityczne

Poprzednie badania (rozdział 8.4.2) wykazały, że przy zastosowaniu odpowiedniego wskaźnika fotometr PEDD pozwala na obserwowanie zmian pH w granicach jego pKa, co można z kolei zastosować do monitorowania reakcji enzymatycznych, których produkty powodują zmiany pH środowiska. W taki sposób można oznaczać zarówno stężenie substratów jak i aktywność enzymu.

Jednym z dydaktycznych przykładów reakcji bioanalitycznych może być reakcja rozkładu mocznika przez ureazę. Ureaza jest jednym z najtańszych, najbardziej aktywnych i stosunkowo trwałych, spośród dostępnych komercyjnie enzymów, dlatego też świetnie nadaje się do modelowych bioanalitycznych eksperymentów edukacyjnych.

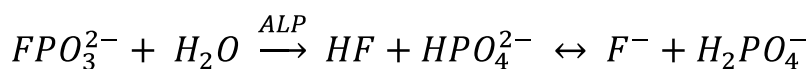


Największą aktywność ureaza wykazuje w roztworach słabo kwaśnych lub obojętnych (pH ok. 6) natomiast powstałe w wyniku reakcji produkty protolityczne silnie alkalizują środowisko do pH ok. 9. Do obserwacji zmian pH w tym zakresie najlepiej nadaje się błękit bromotymolowy (rys. 8.15 i tab. 8.2). Dlatego też przygotowałam 0,01M bufor fosforanowy o pH 6 zawierający 50ppm błękitu bromotymolowego oraz - w zależności od celu oznaczeń - ureazę o aktywności 5 U·mL⁻¹ lub 100mM mocznika. Z każdego wydzieliłam osiem porcji przygotowując roztwory kalibracyjne substratów (o stężeniach mocznika w zakresie 0,5-50mM) oraz enzymu (o aktywnościach ureazy od 0,25 do 15 U·mL⁻¹). Od momentu dodania analitu co 20 sekund przez 5 minut rejestrowałam sygnał dla każdego wzorca. Na wykresach na rysunku 8.16 widać zależności sygnał analitycznego od czasu, zarejestrowane przeze mnie dla mocznika (wykres a) i ureazy (wykres b). Otrzymane przebiegi świetnie ilustrują kinetyczny charakter reakcji enzymatycznych. Dodatkowo wybierając określony interwał czasowy, można dzięki nim sporządzić krzywe kalibracyjne mocznika bądź ureazy.



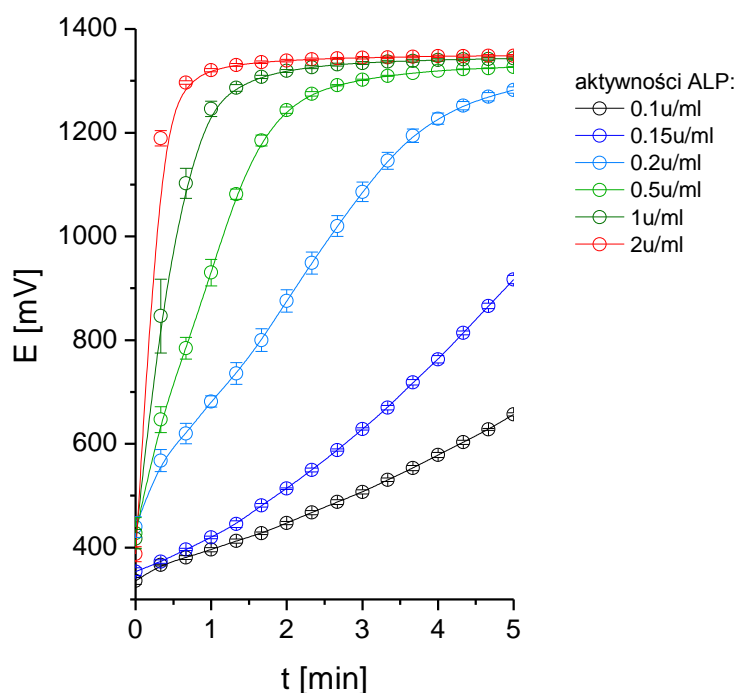
Rysunek 8.16 Krzywe czasowe zarejestrowane dla różnych: a- stężeń mocznika; b- aktywności ureazy.

Inną reakcją enzymatyczną, którą można monitorować za pomocą proponowanego fotometru edukacyjnego PEDD jest hydroliza fosforanów katalizowana fosfatazą alkaliczną (ALP). Fosfataza alkaliczna jest również stosunkowo niedrogim i stabilnym enzymem wygodnym do doświadczeń pokazowych. Aktywność fosfatazy alkalicznej można oznaczać na wiele sposobów, stosując różnorodne substraty. Wybrana przeze mnie metoda zakłada wykorzystanie monofluorofosforanu (MFP) [73].



ALP, której maksimum aktywności przypada na pH ok. 9, katalizuje reakcję hydrolizy monofluorofosforanu powodując zakwaszenie środowiska do pH ok. 7. Odpowiada to zakresowi zmian barwy błękitu tymolowego (TB) z niebieskiej na żółtą.

Pomiary wykonano w nasyconym roztworze wodorotlenku magnezu, w obecności 50ppm TB oraz 10mM MFP. Podobnie jak przy oznaczaniu mocznika pomiary prowadziłam przez 5 minut od chwili dodania ALP do roztworu wyjściowego. Ze względu na zanik niebieskiej formy błękitu tymolowego, z biegiem reakcji enzymatycznej obserwowałam wzrost sygnału (rys. 8.17).



Rysunek 8.17 Krzywe czasowe sporządzone dla różnych aktywności ALP.

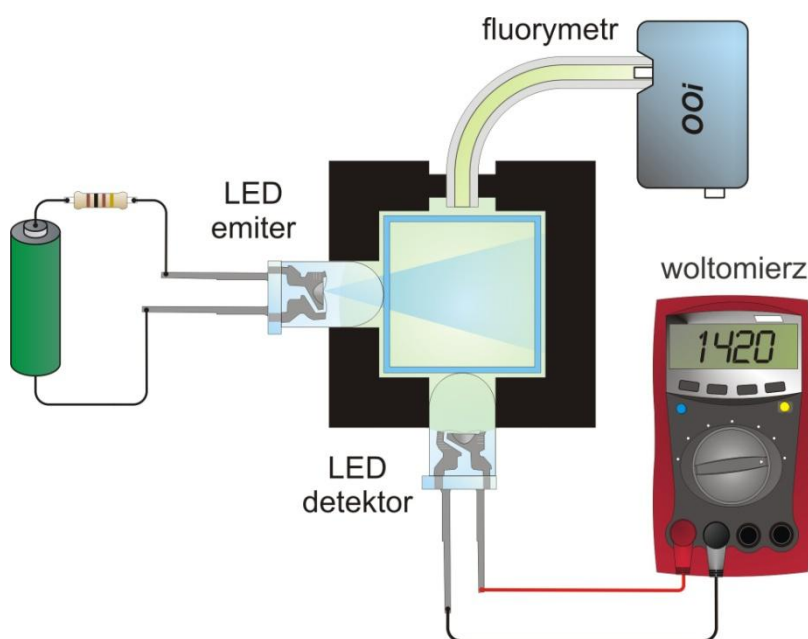
8.5 Podsumowanie

W tym rozdziale pracy przedstawiłam prototypy fotometrycznych PEDDów, zasadę doboru diod elektroluminescencyjnych użytych do ich konstrukcji, oraz model działania systemu detekcyjnego bazujący na równaniach Shockley'ego oraz Lamberta-Beera. Ponadto pokazałam możliwość zmiany sposobu rejestracji sygnału analitycznego, wygenerowanego przez PEDD, pozwalający na zwiększenie czułości oraz stwarzający możliwość sterowania zakresem oznaczalności. Badania były prowadzone z użyciem modelowych analitów: błękitu bromotymolowego oraz chininy. W tym ostatnim przypadku stwierdziłam możliwość detekcji promieniowania emitowanego na skutek fluorescencji. Zagadnieniem tym zajmę się dokładniej w następnej części pracy (rozdział 9). W tym rozdziale skupiłam się również na opracowaniu niezwykle prostego, kompletnego fotometru typu PEDD i pokazaniu jego różnorodnych zastosowań edukacyjnych. Urządzenie mimo drobnych ograniczeń może być doskonałym narzędziem do laboratoryjnych ćwiczeń fizykochemicznych, biochemicznych i czysto analitycznych.

9 Fluorymetryczne pomiary kuwetowe

Badania opisane w rozdziale 2.4.2, prezentujące zastosowanie diody elektroluminescencyjnej jako detektora, związane były wyłącznie z oznaczeniami fotometrycznymi. Jest to prawdopodobnie związane z założeniem, że w pomiarach fluorymetrycznych wymagane są znacznie bardziej czułe detektory takie jak fotopowielacze czy fotodiody lawinowe. Tymczasem podczas próby oceny selektywności detektora przy oznaczaniu chininy (rozdział 7.3.) zaobserwowałam, inwersję krzywej kalibracyjnej spowodowaną rejestrowaniem przez detektor promieniowania emitowanego przez wzbudzony analit. Dlatego też postanowiłam zbadać czy dioda elektroluminescencyjna jest wystarczająco efektywnym źródłem wzbudzenia fluorescencji oraz czy sprawdzi się w roli detektora fluorymetrycznego.

Ponieważ w pomiarach fluorymetrycznych detektor i źródło promieniowania są przeważnie umiejscowione w stosunku do siebie prostopadle, wprowadziłam odpowiednie zmiany w konstrukcji celi pomiarowej. Po jednej stronie źródła, prostopadle do niego, umieściłam mocowanie detektora LED. Miało to zapobiec docieraniu wiązki promieniowania emitera do detektora. Po drugiej stronie źródła, naprzeciwko diody detektora, za pomocą światłowodu podłączyłam fluorymetr CCD Ocean Optics (rys. 9.1), który umożliwił prowadzenie równoległych pomiarów referencyjnych.

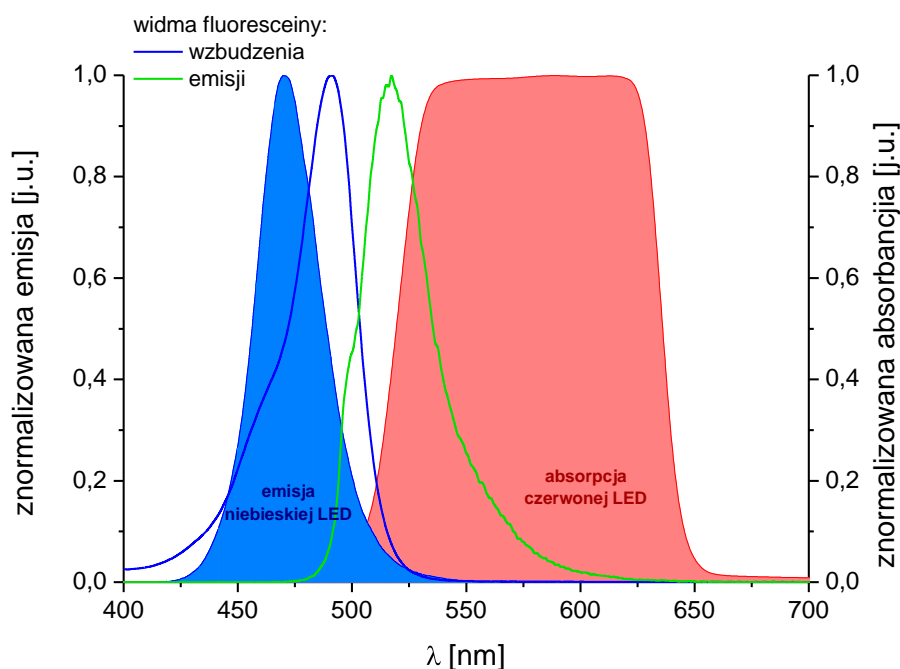


Rysunek 9.1 Budowa fluorymetrycznego układu pomiarowego.

9.1 Fluorymetryczne oznaczanie fluoresceiny

Do wstępnych testów wybrałam fluoresceinę, najpopularniejszą modelową substancję, charakteryzującą się dużą wydajnością kwantową fluorescencji.

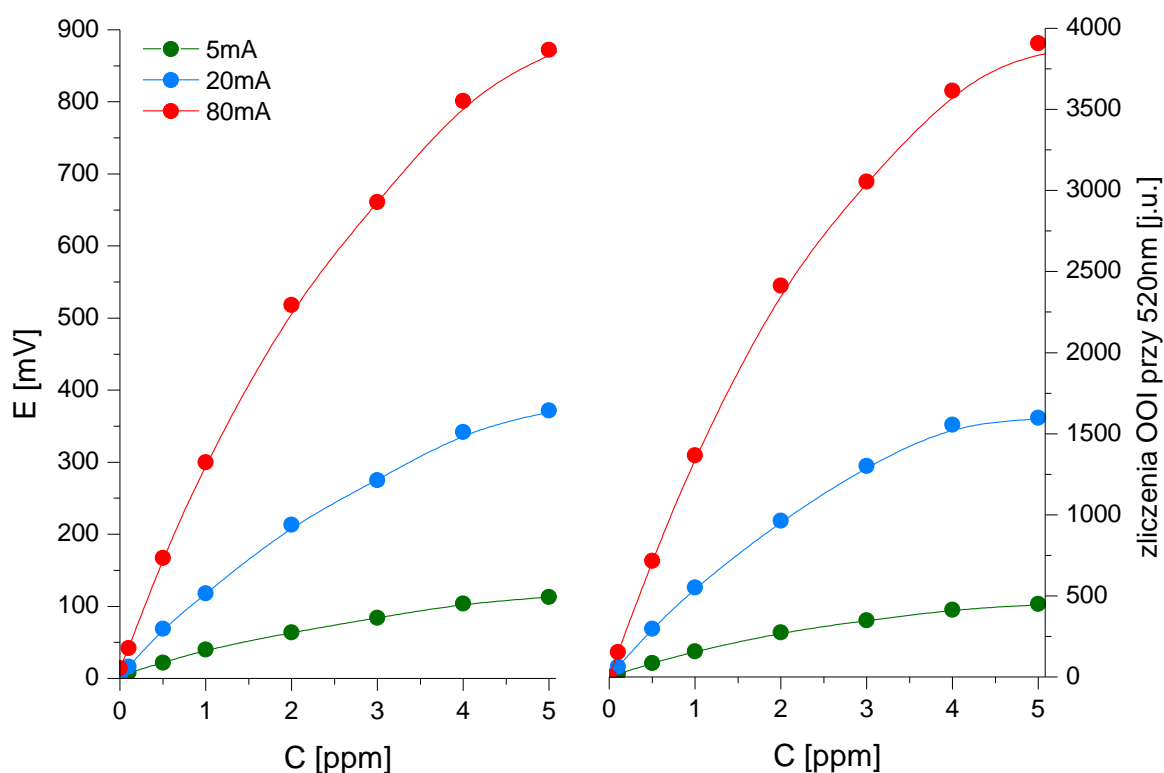
Maksimum wzbudzenia fluoresceiny przypada przy długości fali 490nm natomiast emisji 520nm, stąd do jej oznaczeń wybrałam niebieski emiter (475nm) i czerwony detektor (630nm) (rys. 9.2). W tym przypadku jednak użyłam innych diod niż w pomiarach fotometrycznych modeli, (z mniejszym kątem emisji- 30° i większą światłością: 5,8Cd dla diody niebieskiej i 7Cd czerwonej). W przypadku źródła, mniejszy kąt emisji zapobiega dostawaniu się promieniowania do detektora, natomiast większa światłość zwiększa fluorescencję analitu. Zmiana detektora wynikała z większej czułości diody 7Cd względem 1,5Cd (rys. 9.2).



Rysunek 9.2 Widma wzbudzenia i emisji fluoresceiny oraz zakres emisji niebieskiej LED i czułości spektralnej czerwonej LED.

Ponieważ największą wydajność fluorescencji, fluoresceina wykazuje w środowisku alkalicznym (pH ok 9), wzorce kalibracyjne w przedziale stężeń od 0,1 do 5 ppm przygotowałam w 0,01M roztworze czteroboranu sodu.

Wykonałam 3 krzywe kalibracyjne dla różnych prądów zasilania emitera: 5, 20 i 10mA, rejestrując równocześnie sygnały za pomocą czerwonej diody elektroluminescencyjnej podłączonej do multimetru oraz spektrofluorymetru Ocean Optics. Wyniki eksperymentu zaprezentowałam na rysunku 9.3.



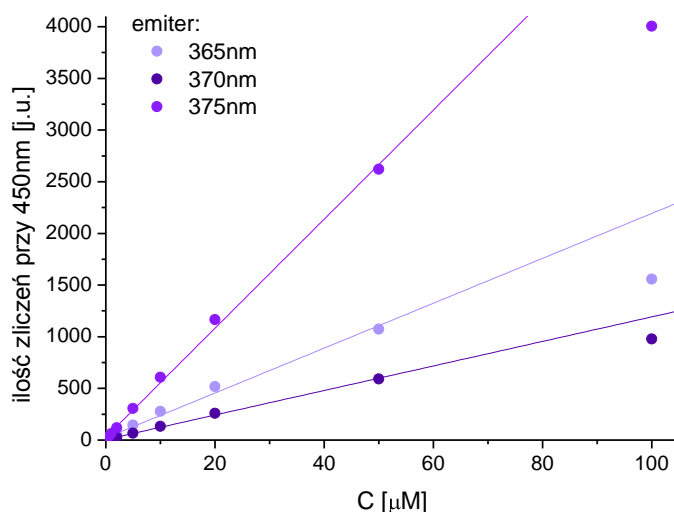
Rysunek 9.3 Krzywe kalibracyjne fluoresceiny dla 3 różnych prądów zasilania emitera, zarejestrowane za pomocą konwencjonalnego detektora fluorymetrycznego oraz fluorymetrycznego detektora PEDD.

Krzywe kalibracyjne otrzymane za pomocą konwencjonalnego detektora spektrofluorymetrycznego nie odbiegają od tych otrzymanych przy użyciu czerwonej diody elektroluminescencyjnej jako detektora. Kształt krzywej napięciowej zarejestrowanej za pomocą czerwonej diody detektora, bardzo dobrze oddaje kształt zależności intensywności fluorescencji od stężenia otrzymanej za pomocą spektrofluorymetru. Oznacza to, że detektor typu PEDD sprawdza się również w pomiarach fluorymetrycznych. Co więcej, wraz ze wzrostem intensywności emisji źródła zwiększa się czułość pomiarów oraz obniża granica oznaczalności, która wynosi odpowiednio 30, 13 i 9ppb odpowiednio dla prądów 5, 20 i 80mA. Wysoka wartość zarejestrowanego sygnału pozwala również przypuszczać, że detektory typu PEDD mogą być użyte do oznaczania substancji o mniejszej wydajności fluorescencji.

9.2 Fluorymetryczne oznaczanie chininy

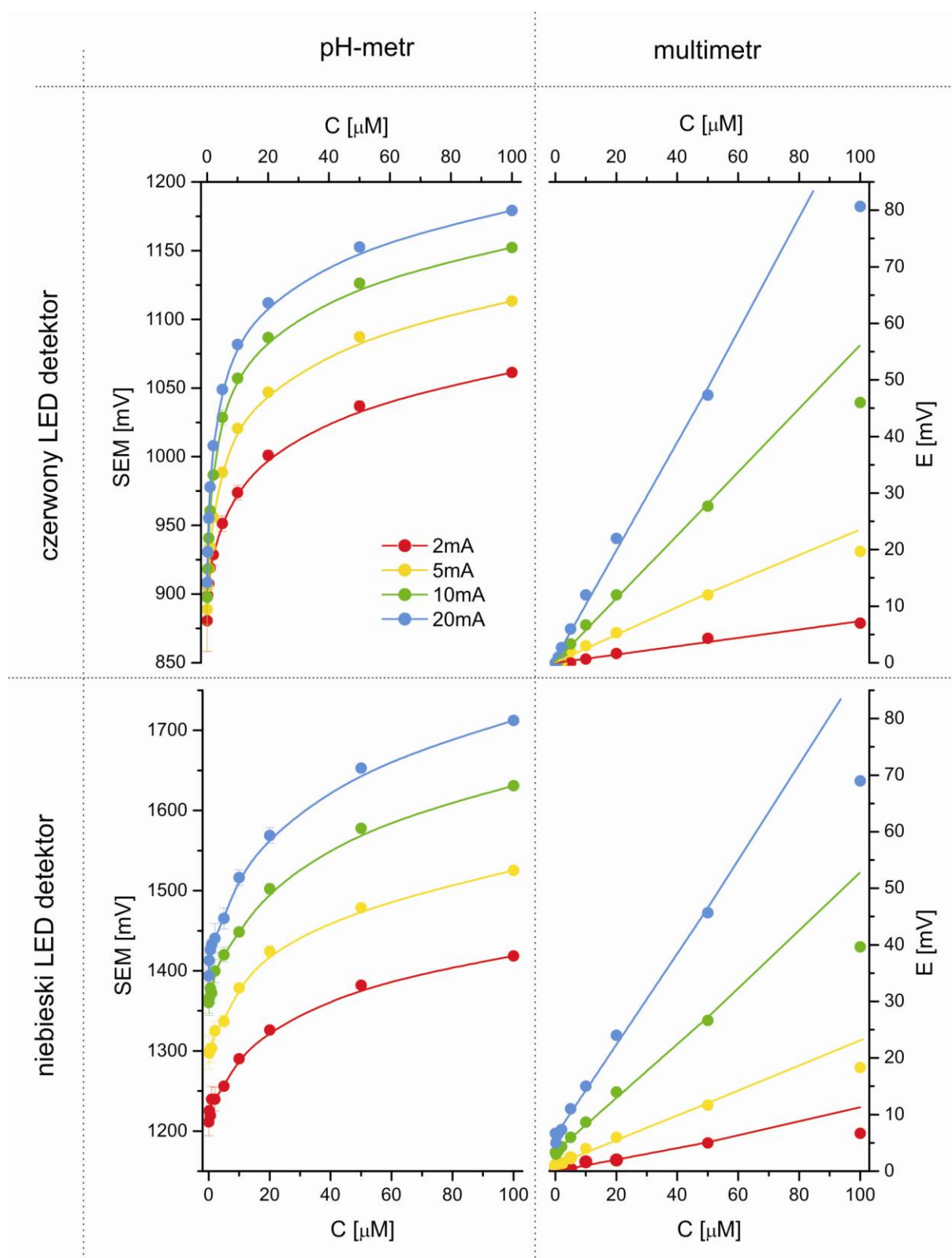
Jako kolejny modelowy analit wybrałam badaną wcześniej fotometrycznie chininę (rozdział 8.3). Do oznaczeń zastosowałam roztwory sporządzone identycznie jak w przypadku pomiarów fotometrycznych. Wybrałam również te same potencjalne źródła promieniowania, natomiast jako detektory fluorescencji wybrałam wyłącznie czerwoną i niebieską diodę, które jak widać na wykresie 8.8 są czułe na promieniowanie emitowane przez chininę.

W pierwszym etapie eksperymentu postanowiłam wytypować najlepszy emiter. W tym celu za pomocą spektrofluorymetru zarejestrowałam krzywe kalibracyjne, dla każdego ze źródeł przy maksymalnym prądzie zasilania. Diody UV są dosyć delikatnymi urządzeniami i ulegają zniszczeniu przy natężeniu powyżej 25mA. Stąd maksymalne natężenie prądu zasilania źródła nie przekraczało 20mA. Wyniki pomiarów przedstawiam na rysunku poniżej.



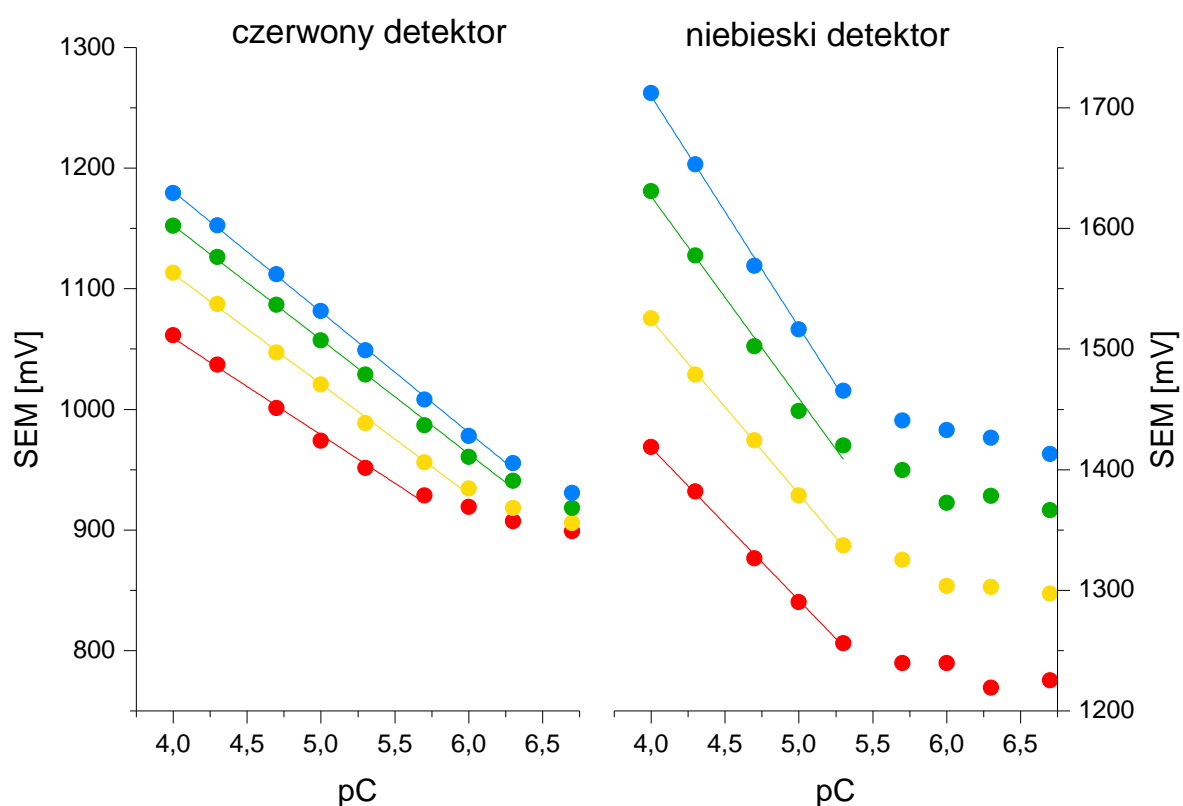
Rysunek 9.4 Krzywe kalibracyjne chininy, dla różnych źródeł wzbudzenia, zarejestrowane spektrofluorymetrem OOI.

Najlepiej dopasowanym spektralnie do widma wzbudzenia chininy, źródłem jest dioda emitująca przy 365nm, jednak jak widać na wykresie 8.8 jest to bardzo słaby emiter. (moc $3\text{mW} \approx 8\mu\text{Cd/sr}$) Znacznie większą intensywność przy tej samej długości fali pozwala uzyskać dioda 375nm ($11\text{mW} \approx 16\mu\text{Cd/sr}$) i jak pokazano na rysunku 9.4, to właśnie dla wzbudzenia tym źródłem uzyskuje się największą wydajność fluorescencji. Stąd też w tym przypadku natężenie promieniowania źródła miało znacznie większy wpływ na intensywność fluorescencji, niż zgodność widm. Do kolejnych eksperymentów jako emiter wybrałam diodę 375nm.



Rysunek 9.5 Krzywe kalibracyjne dla chininy sporządzone za pomocą pH-metru i multimetru dla czerwonego i niebieskiego detektora.

Z wybranym emitery zarejestrowałam krzywe kalibracyjne z użyciem różnych detektorów i mierników i otrzymałam dosyć zaskakujące rezultaty (rys. 9.5). Odwrotnie niż w przypadku pomiarów fotometrycznych, prostoliniową zależność w szerokim zakresie stężeń otrzymałam przy pomiarach napięcia, równocześnie obserwując dla nich znacznie mniejszą czułość. Natomiast krzywe w przypadku pomiarów siły elektromotorycznej miały charakter logarytmiczny. Dlatego też przeliczyłam stężenie chininy wyrażone w mikromolach na ujemny logarytm – pC. Przy takim sposobie wyrażenia stężenia, zależność przyjmuje prostoliniowy charakter (rys. 9.6).



Rysunek 9.6 Zależność ujemnego logarytmu ze stężenia chininy od siły elektromotorycznej wygenerowanej na detektorze.

Analogicznie jak przy fotometrycznych oznaczeniach chininy przeprowadziłam testy z próbkami rzeczywistymi dla tych samych czterech rodzajów toników. Rezultaty wstępnych oznaczeń (tab. 9.1) okazały się nie zgodne ze spektrofotometryczną metodą referencyjną. Dlatego też aby zapobiec ewentualnym interferencjom kolejne pomiary wykonałam po usunięciu anionów chlorkowych przez przepuszczenie próbki przez kolumnę jonowymienną (Amberlite IRA-904). Uzyskane w ten sposób wyniki charakteryzowały się znacznie lepszą

zgodnością z metodą referencyjną, co potwierdza użyteczność analityczną fluorymetrycznego detektora typu PEDD. Jak widać dioda elektroluminescencyjna może być skutecznym detektorem fluorescencji.

Tabela 9.1 Wyniki oznaczeń chininy w próbkach toników otrzymane metodą referencyjną a także za pomocą fotometru PEDD i fluorymetru PEDD

Próbka	Pomiar referencyjny- fotometryczny [μM]	Pomiar PEDD (w obecności Cl^-) [μM]	Pomiar PEDD (po usunięciu Cl^-) [μM]
Kinley	100 \pm 3	71 \pm 3	98 \pm 2
Zbyszko	50 \pm 2	34 \pm 2	50 \pm 2
Schweepes	110 \pm 2	59 \pm 4	109 \pm 1
Ustronianka	36 \pm 1	28 \pm 1	34 \pm 1

9.3 Opis działania fluorymetru PEDD

Przedstawione w poprzednim podrozdziale zachowanie detektora diody elektroluminescencyjnej (rys. 9.5 i 9.6) odbiega od modelu teoretycznego przedstawionego w rozdziale 8.1, jednak można je wyjaśnić na drodze innych przekształceń.

Zależność potencjału wygenerowanego na diodzie detektorze od intensywności padającego na nią promieniowania, wyprowadzona w rozdziale 8.1

$$E = a + B \log I$$

można dostosować do warunków fluorymetrycznych:

$$E_F = a + B \log I_F$$

gdzie I_F to intensywność promieniowania emitowanego przez analit na drodze fluorescencji.

Ponieważ wiadomo że [74]:

$$I_F = K_F I_0 \eta_F \varepsilon l C$$

gdzie: I_0 to intensywność promieniowania wzbudzającego a η_F wydajność kwantowa fluorescencji, wcześniejsze równanie można przekształcić do postaci:

$$E_F = a + B \log(K_F I_0 \eta_F \varepsilon l C) = a + B \log(K_F I_0 \eta_F \varepsilon l) + B \log C$$

i uprościć do postaci:

$$E_F = A + B \log C$$

gdzie:

$A = nE_T \ln i_S + 2,03025nE_T \log\left(\frac{\Omega \bar{e}}{\eta h\nu}\right) \log(K_F I_0 \eta_F \varepsilon l)$, natomiast tak jak w przypadku pomiarów fotometrycznych $B = 2,3025nE_T \log\left(\frac{\Omega \bar{e}}{\eta h\nu}\right)$.

Przedstawione przekształcenia wyjaśniają dlaczego SEM generowana na detektorze fluorymetrycznym jest wprost proporcjonalna do logarytmu stężenia. Co więcej, biorąc pod uwagę, że w technikach fotometrycznych natężenie promieniowania docierające do źródła jest wykładniczą funkcją stężenia, natomiast we fluorymetrii wartości te są wprost proporcjonalne, przedstawiony model „fluorymetryczny” jest logicznym następstwem modelu „fotometrycznego”.

W kwestii zachowania poszczególnych detektorów, czerwona dioda charakteryzowała się szerszym zakresem prostoliniowości wskazań, natomiast niebieski detektor pozwalał uzyskać większą czułość kosztem wyższej granicy oznaczalności. Ponadto, w obu przypadkach zaobserwowałam, że zmniejszanie intensywności emisji źródła powoduje spadek czułości i zmniejszenie zakresu oznaczalności tak samo jak miało to miejsce w testach z fluoresceiną.

9.4 Podsumowanie

W tej części badań, posługując się modelowymi analitami (fluoresceiną i chininą), udowodniłam eksperymentalnie, że urządzenia typu PEDD mogą być użyte także do pomiarów fluorymetrycznych. Ponadto przedstawiłam proste matematyczne wytłumaczenie liniowości otrzymanych charakterystyk, a także zademonstrowałam przykładowe praktyczne zastosowanie detektora chininowego.

Badania przedstawione w rozdziałach 8 i 9 dotyczyły tzw. pomiarów kuwetowych (stacjonarnych). W dalszych częściach rozprawy przedstawię możliwość stosowania fotometrycznych i fluorymetrycznych detektorów PEDD do pomiarów niestacjonarnych, prowadzonych w warunkach analizy przepływowej.

10 Fotometryczne detektory przepływowe

Ponieważ diody elektroluminescencyjne są detektorami charakteryzującymi się bardzo krótkim czasem odpowiedzi, postanowiłam sprawdzić ich przydatność również w analizie przepływowej, gdzie mierzony sygnał analityczny jest niestacjonarny i szybko zmienia się w czasie, a więc gdzie wymagana jest duża czułość i dynamika detektora.

Podstawowym założeniem analizy przepływowej jest mechanizacja procesu przygotowania i analizy próbki. Konkretny układ przeznaczony jest do oznaczeń konkretnej, wybranej substancji bądź grupy związków. Co za tym idzie w metodzie tej preferowane są raczej prostsze, dedykowane systemy detekcyjne niż kosztowne urządzenia uniwersalne. Nic więc dziwnego, że większość zastosowań analitycznych sparowanych diod elektroluminescencyjnych dotyczyła właśnie analizy przepływowej (rozdział 4.2).

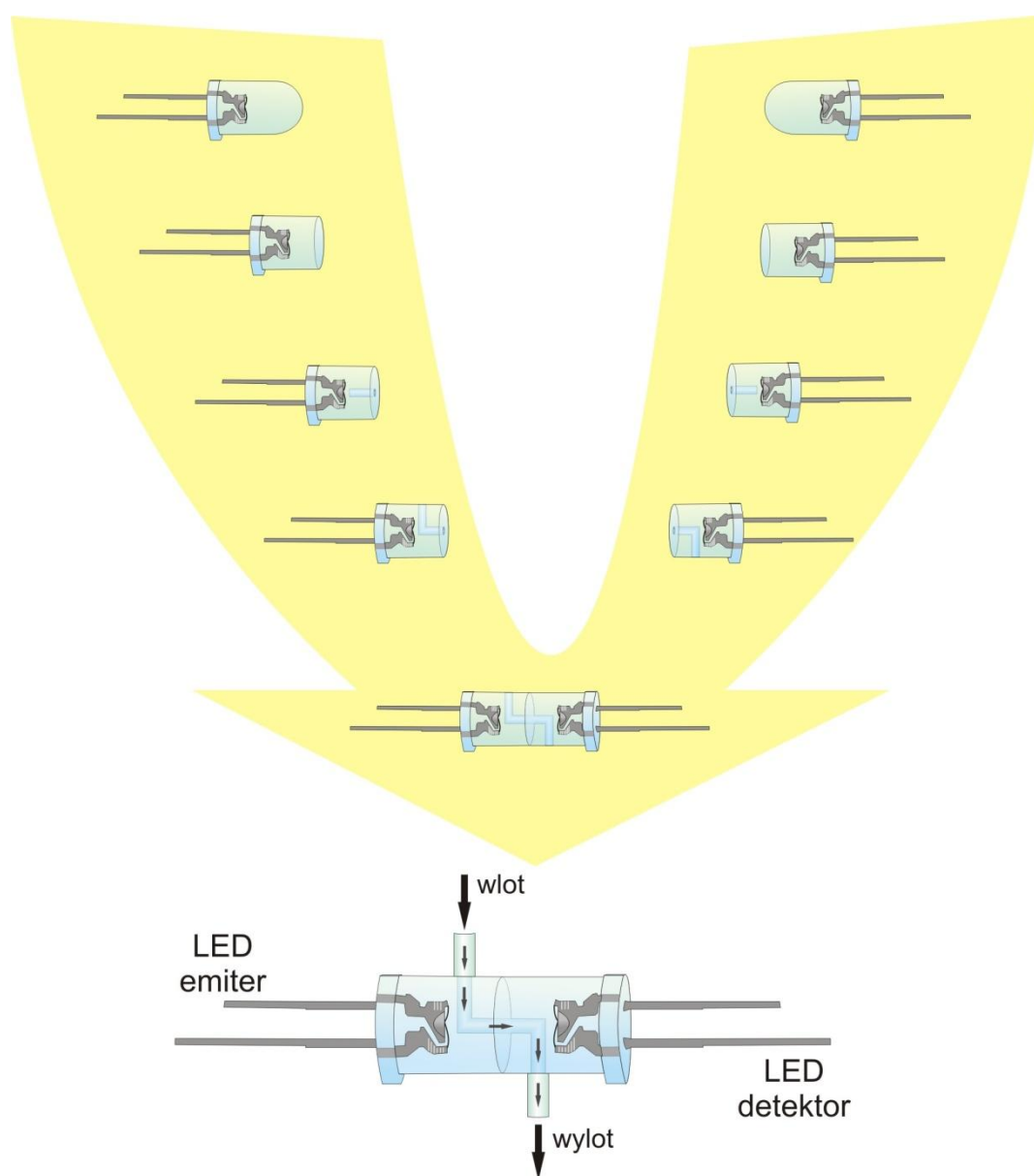
Selekcja systemów diod do konstrukcji układu analitycznego zależy oczywiście od analitu lub reakcji jakiej ulega on w trakcie oznaczania, natomiast z technicznego punktu widzenia najistotniejszym pozostaje problem konstrukcji celi pomiarowej i zintegrowania go z systemem przepływowym.

10.1 Oznaczanie błękitu bromotymolowego

Badanie przydatności detektorów typu PEDD w analizie przepływowej postanowiłam przeprowadzić stosując najprostszy, jednokanałowy układ przepływowy, z pompą perystaltyczną (Gilson Minipuls 3) oraz ręcznym zaworem wstrzykowym (Rheodyne 5020). Do tych badań użyłam modelowy barwnik, czyli stosowany wcześniej błękit bromotymolowy. Tak jak wcześniej w roli źródła i detektora promieniowania posłużyły mi dwie identyczne czerwone diody elektroluminescencyjne oraz pH-metr jako rejestrator (miernik). Wzorce BBT o stężeniach od 5 do 35ppm były przygotowane ta samo jak dla pomiarów kuwetowych (rozdział 8.1).

Koncepcję detektora przepływowego zaczerpnęłam z jednej z prac grupy Diamonda [60], z tą różnicą, że do wykonania swojego naczynka użyłam diody o średnicy 10mm (λ_{\max} -630nm, światłość-1,6Cd, kąt świecenia-40°). Procedurę wytwarzania detektora ilustruje rysunek 10.1. Na początku za pomocą frezarki usunięte zostały soczewki diod. Następnie w każdej wytworzono po dwa kanały: pierwszy średnicy 3mm w centralnym punkcie płaszczyzny czoła nad chipem diody- stanowiący część drogi optycznej, oraz drugi

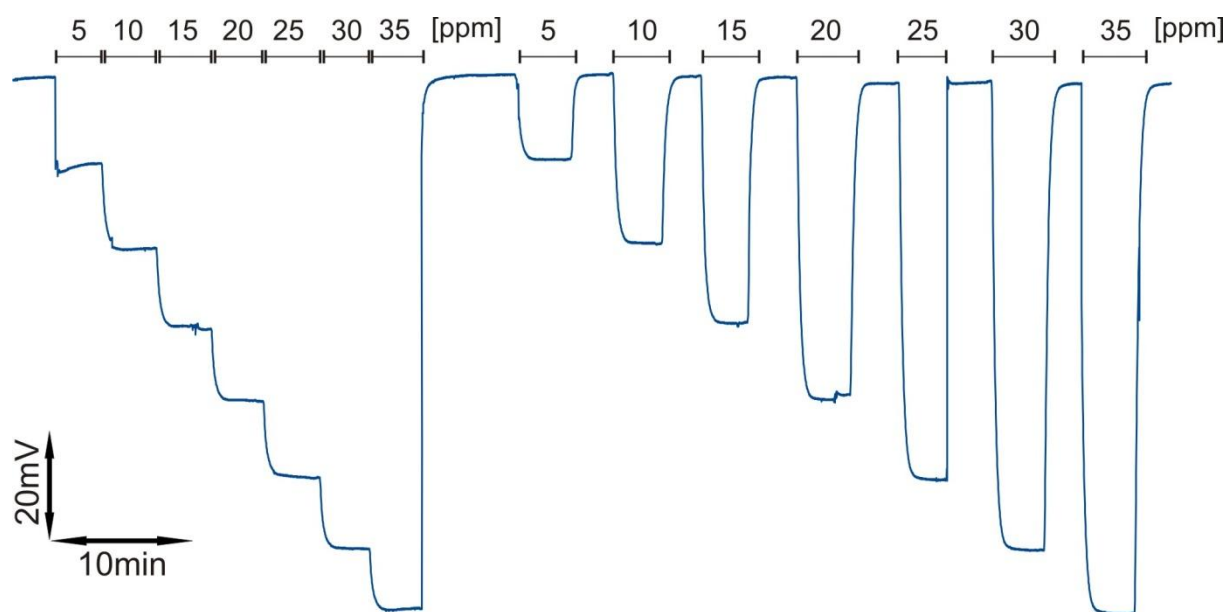
prostopadły do niego, do podłączenia elementów układu przepływowego. Tak przygotowane diody sklejałam klejem cyjanoakrylowym. Ponieważ kleje tego typu mają tendencje do matowienia plastikowych powierzchni, a przy tym charakteryzują się niewielką gęstością i lotnością, całą tą operację należy przeprowadzać ze szczególną ostrożnością. Trzeba użyć takiej ilości kleju, aby nie dostał się on do wnętrza kanałów i ich nie zablokował, a zarazem żeby powstało szczelne połączenie. Ponadto chcąc poprawić szczelność nakładałam dodatkową warstwę kleju na boki naczynka dookoła spoiny. Otrzymane w ten sposób naczynko przepływowe i detektor (rys. 10.1) charakteryzowało się zadowalającą trwałością, szczelnością i odpornością mechaniczną.



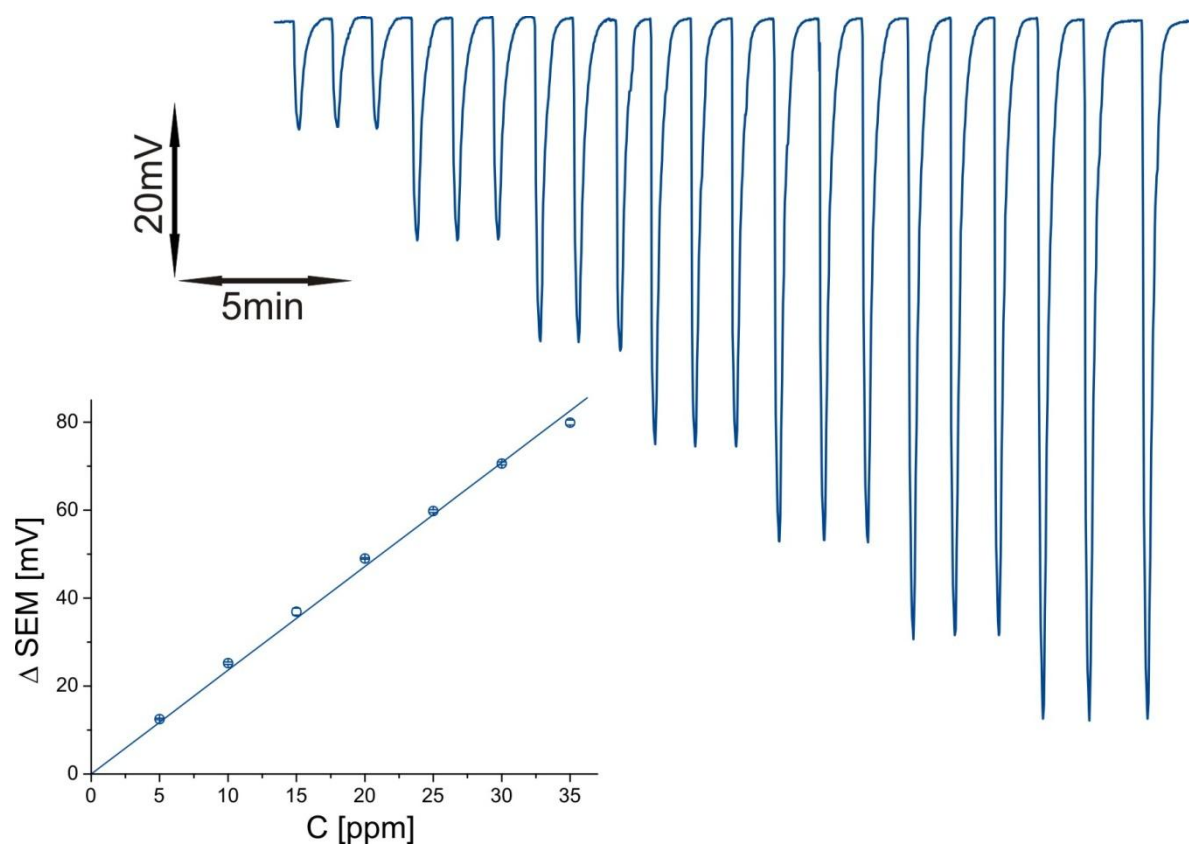
Rysunek 10.1 Etapy konstrukcji fotometrycznego detektora przepływowego typu PEDD.

Testy detektora przeprowadziłam dla różnych wariantów pomiarów: w warunkach ciągłego przepływu wzorca i jego wstrzykiwania. Pomiary w warunkach ciągłego przepływu polegały na doprowadzeniu do detektora PEDD, za pomocą prostego jednokanałowego układu przepływowego, roztworu błękitu bromotymolowego o zmieniającym się stężeniu. W pierwszym teście kolejne wzorce, o rosnącym stężeniu BBT, były dostarczane do detektora bezpośrednio po sobie, poprzez zanurzenie wężyka wprowadzającego pompy perystaltycznej w odpowiednie naczynie (szybkość pompowania wynosiła 3,8mL/min). W ten sposób sprawdziłam czy detektor reaguje na zmiany stężenia indykatora. Następnie do detektora na zmianę tłoczony był bufor boranowy i roztwór BBT, co z kolei wykazało stabilność sygnału i linii bazowej. Wyniki eksperymentu pokazano na rysunku 10.2. Po zakończeniu tych prób do układu przepływowego dołączyłam zawór wstrzykowy z pętlą o pojemności 0,3mL i dla tych samych wzorców rejestrowałam sygnały w warunkach niestacjonarnych (rys. 10.3).

Rezultaty badań w przepływie ciągłym (rys. 10.2) potwierdzają, że dzięki niewielkiemu szumowi detektora możliwe jest otrzymanie stabilnej linii bazowej. Pomiary są powtarzalne a rejestrowane zmiany siły elektromotorycznej detektora liniowo zależne od stężenia BTB w analizowanym zakresie. Również konwencjonalne pomiary przepływowo-wstrzykowe z kolejnymi iniekcjami roztworów błękitu bromotymolowego o zmieniającym się stężeniu, doprowadziły do zadowalających rezultatów, które zostały zobrazowane w postaci przebiegu oraz wynikającej krzywej kalibracyjnej (rys 10.3). Wysoka powtarzalność a także stabilność linii bazowej oraz odtwarzalność sygnałów stanowią potwierdzenie użyteczności opracowanego detektora do pomiarów w warunkach ciągłej i wstrzykowej analizy przepływowej.



Rysunek 10.2 Stacjonarne oznaczenia BBT za pomocą detektora przepływowego PEDD.

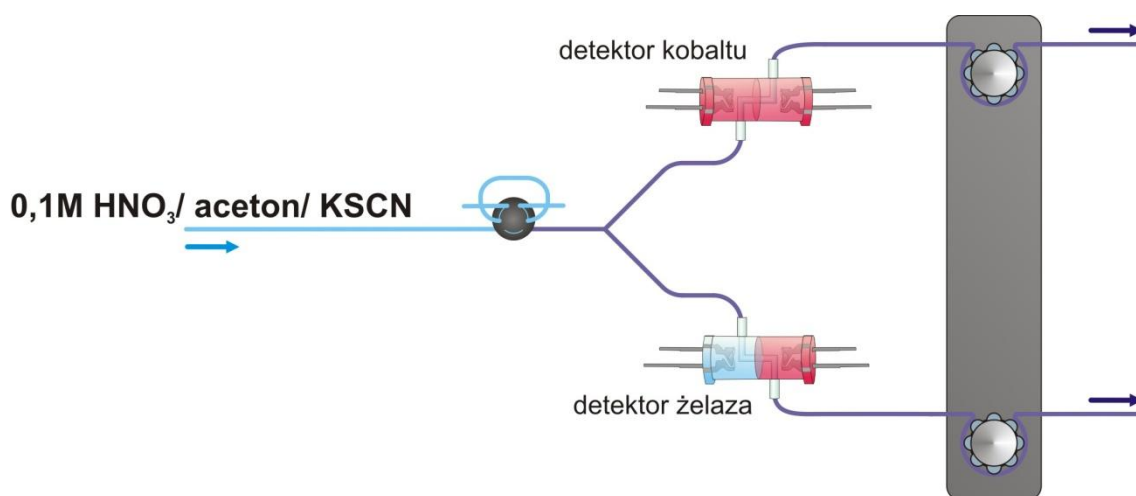


Rysunek 10.3 Oznaczanie BBT metodą wstrzykowej analizy przepływowej, za pomocą detektora PEDD. Przebieg oraz wynikająca z niego krzywa kalibracyjna.

10.2 Oznaczanie kompleksów rodankowych kobaltu i żelaza(III)

Ponieważ przepływowy detektor PEDD sprawdził się w oznaczeniach modelowego analitu, postanowiłam sprawdzić go w nieco bardziej złożonym układzie, dedykowanym do oznaczeń kompleksów rodankowych kobaltu i żelaza(III). Badania wstępne dotyczące tego urządzenia przedstawiłam w rozdziale 8.2. Ze względu na złożoną procedurę przygotowania próbki i konieczność prowadzenia pomiarów w ścisłym reżimie czasowym, analiza przepływowa wydaje się idealnym rozwiązaniem do takich oznaczeń. Dodatkowo badanie to pozwoliło mi przetestować możliwości niezależnego synchronicznego działania dwóch detektorów PEDD w jednym układzie przepływowym.

Biorąc pod uwagę wszystkie czynności przygotowawcze, układ przepływowy dedykowany do oznaczania kompleksów rodankowych kobaltu i żelaza(III), powinien posiadać trzy linie dostarczające roztwór nośnika - 0,1M kwas azotowy(V), aceton i KSCN, które powinny się mieszać odpowiednio w stosunku 1:2:2. W praktyce taka konstrukcja układu okazało się jednak dosyć problematyczna. Gęsty roztwór rodanków stosunkowo powoli mieszał się z acetonem a gotowy odczynnik kompleksujący z próbką, w wyniku czego powstawał bardzo słabo zabarwiony roztwór, co automatycznie pogarszało jakość oznaczeń. Dlatego też zdecydowałam się na znacznie prostszą konstrukcję układu, przedstawioną schematycznie na rysunku 10.4 co niestety wiązało się z koniecznością wstrzykiwania gotowych próbek z odczynnikiem kompleksującym. Umieszczenie pompy perystaltycznej na końcu układu miało na celu zapewnienie jednakowego przepływu przez obydwa detektory.

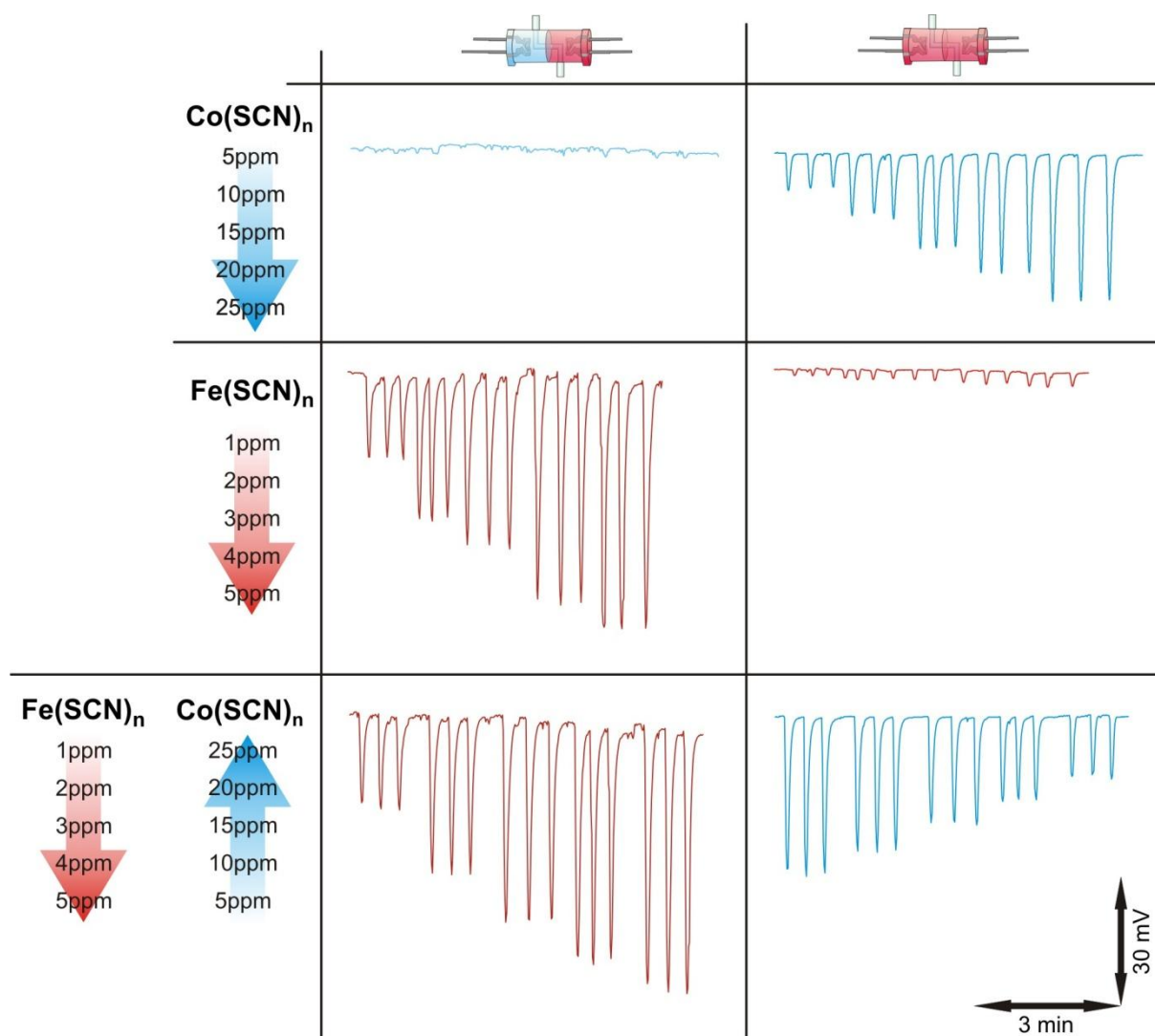


Rysunek 10.4 Schemat układu przepływowego do oznaczeń jonów kobaltu i żelaza metodą rodankową.

W badaniach użyłam tych samych roztworów wzorców co w pomiarach kuwetowych (rozdział 8.3). Detektory przepływowe wykonane były tak samo jak poprzednio (rys. 10.1). Detektor jonów kobaltu wykonany był z dwóch czerwonych diod elektroluminescencyjnych, natomiast dla jonów żelaza z niebieskiego emitery i czerwonego detektora. Przeprowadziłam również test selektywności wstrzykując kolejno roztwory wzorcowe zawierające jednocześnie jony kobaltu jak i żelaza. Stężenie Fe^{3+} rosło a Co^{2+} malało w każdym kolejnym wzorcu, dzięki czemu mogłam upewnić się czy wygenerowane na detektorach sygnały pochodzą od odpowiednich analitów. Otrzymane wyniki przedstawiono na rysunku 10.5.

Otrzymane rezultaty jednoznacznie świadczą o selektywności detektorów typu PEDD. Każdy detektor odpowiada tylko na zmiany stężenia jonów do których oznaczenia był dedykowany. Dzięki temu możliwe jest również niezależne oznaczanie poszczególnych jonów w mieszaninie. Poza tym widać, że zdecydowanie większą stabilnością i powtarzalnością cechowała się para czerwonych LED dedykowanych do oznaczeń kobaltu. Najprawdopodobniej jest to związane z mniejszą stabilnością niebieskiej LED jako emitery, o czym świadczą (widoczne na odpowiednich przebiegach na rys. 10.5) szумы zarejestrowane podczas oznaczeń Co^{2+} oraz niestabilność linii podstawowej w trakcie oznaczeń żelaza. Zakłócenia zarejestrowane za pomocą detektora złożonego z dwóch czerwonych LED pojawiają się równocześnie z pikami żelaza i rosną wraz z jego stężeniem. Zapewne ich powstawanie wiąże się z pokrywaniem się szerokiego widma absorpcji jonów Fe^{3+} (400 do ok 590nm) z widmem emisyjnym czerwonej LED (ok 580 do 660nm).

Podczas prowadzenia powyższych oznaczeń napotkałam pewne trudności, związane z niedoskonałościami konstrukcyjnymi detektora. W elementach układu przepływowego wytworzone jest zmniejszone ciśnienie co powoduje wrzenie acetonu i powstawanie bąbli gazu. Te z kolei, ze względu na geometrię celi i chropowatość wewnętrznych kanałów, zatrzymują się w naczyniu pomiarowym i są przyczyną zakłóceń. Dlatego też w dalszym toku badań postanowiłam sprawdzić inne konstrukcje detektora.



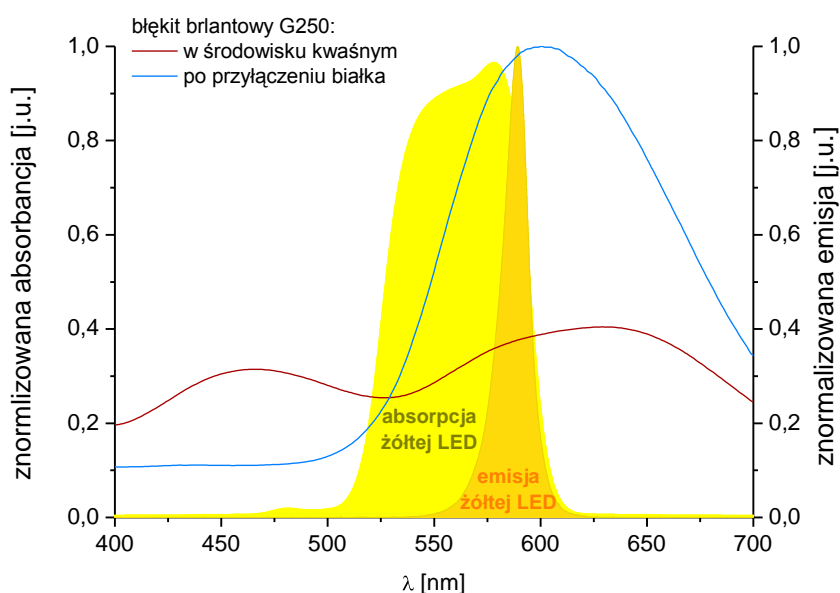
Rysunek 10.5 Porównanie odpowiedzi dedykowanych detektorów na różne warianty kalibracji rodanków kobaltu i żelaza.

10.3 Oznaczanie białka całkowitego metodą Bradford

Ostatnim sprawdzianem użyteczności analitycznej fotometrycznego przepływowego detektora PEDD było zaadoptowanie go do oznaczania białka całkowitego metodą Bradford [75]. Jest to jedna z najpopularniejszych fotometrycznych metod oznaczania białek, obok metody biuretovej [76] i Lowry'ego [77]. Metody te zostały z powodzeniem zaadaptowane do oznaczeń w warunkach przepływowych [78,79]. Zdecydowałam się na metodę Bradford ponieważ jest ona szybka i w przeciwieństwie do pozostałych metod fotometrycznych nie wymaga termostatowania próbki.

W metodzie Bradford stosowany jest Błękit Brylantowy G250 (BB), który w środowisku silnie kwaśnym jest zabarwiony na czerwono, natomiast w wyniku tworzenia

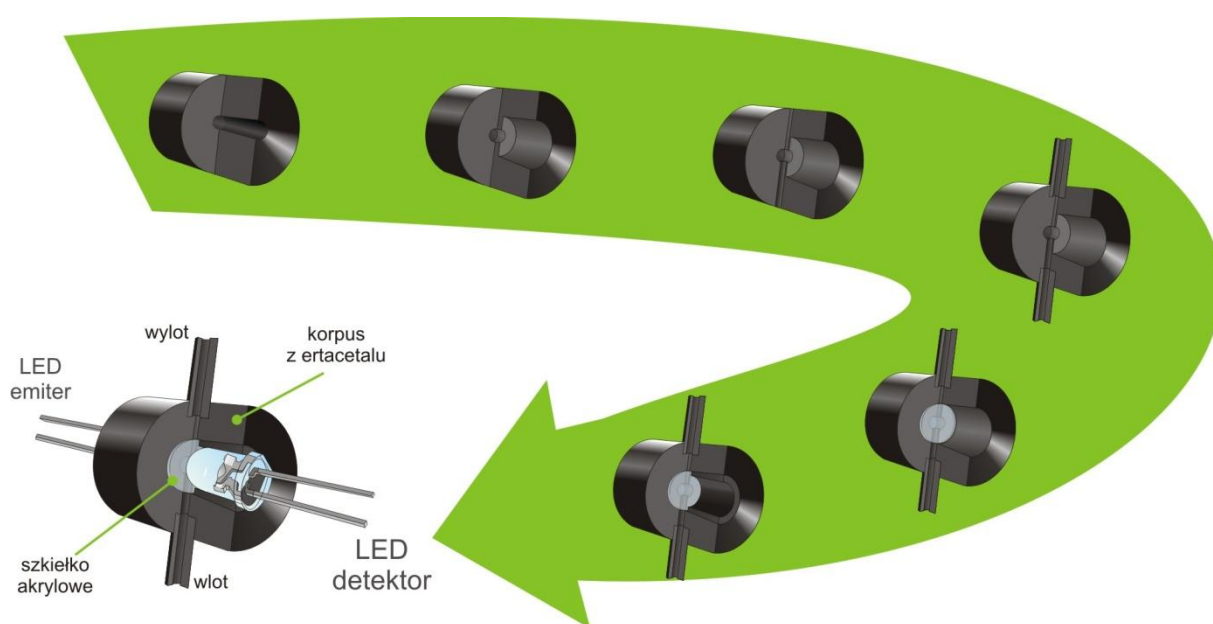
kompleksu barwnik-białko, zmienia kolor na niebieski. Kompleks powstaje na skutek elektrostatycznego oddziaływania kwaśnych grup sulfonowych barwnika z zasadowymi i aromatycznymi aminokwasami. Na skutek reakcji maksimum absorpcji barwnika przesuwają się z 465 na 595nm. Stąd też na źródło promieniowania wybrałam żółtą diodę elektroluminescencyjną o maksimum emisji 3Cd przypadającym na 595nm. Jako detektory przetestowałam różne żółte LED. Najlepiej sprawdziła się dioda o maksimum emisji przy 590nm i światłości 10Cd, która pozwalała uzyskać od 2 do 20% wyższe sygnały niż pozostałe testowane detektory. Odpowiednie widma indywiduów chemicznych i użytych diod pokazano na rysunku 10.6.



Rysunek 10.6 Zakres czułości spektralnej i emisji wybranej pary emiter detektor, oraz widma absorpcji błękitu brylantowego w formie kwaśnej oraz kompleksu z białkiem

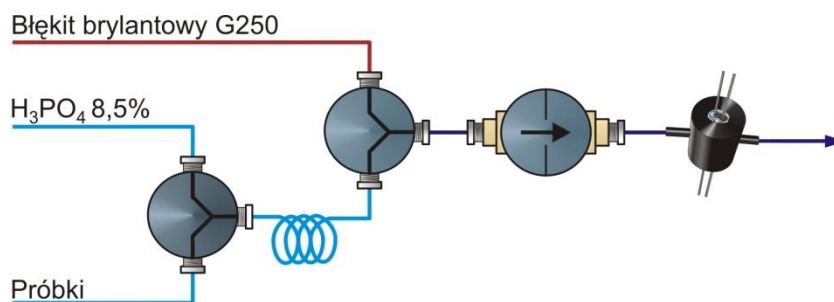
Dzięki zastosowaniu systemu MCFA (*Multi Comutated Flow Analysis*), w badaniach tych mogłam ocenić zachowanie detektora podczas pracy w warunkach pulsacyjnego przepływu. Dodatkowo był to również test nowej konstrukcji detektora. Naczynko przepływowe skonstruowałam z cylindrycznego bloku (średnica 15mm, wysokość 20mm) ertacetalu- czarnego tworzywa o dużej trwałości mechanicznej. W centralnym punkcie podstawy wywierciłam podłużny kanał o średnicy 2mm. Kanał ten po obydwu stronach, do głębokości 8,5mm, poszerzyłam do 7mm średnicy. Następnie przez środek wywierciłam 1mm poprzeczny otwór, w którym później umocowałam dreny, stanowiące wlot i wylot naczynia. W poszerzonych otworach umieściłam dwa szkiełka akrylowe, które docisnęłam

i przytwierdziłam przygotowanymi wcześniej pierścieniami o wysokości 8mm, średnicy zewnętrznej 7,2mm i wewnętrznej 5mm, odpowiadającej rozmiarom diody elektroluminescencyjnej. Otrzymane w ten sposób naczynie (rys. 10.7) ma niewielką objętość martwą (60µL) a dzięki umieszczeniu w jednej linii wlotu i wylotu udało mi się zniwelować osadzanie się pęcherzyków powietrza. Wiąże się to jednak ze znacznym skróceniem drogi optycznej (3mm) i obniżeniem czułości. Jednak ze względu na bardzo intensywne zabarwienie produktów reakcji, w tym konkretnym przypadku rozwiązanie to okazało się wystarczające.



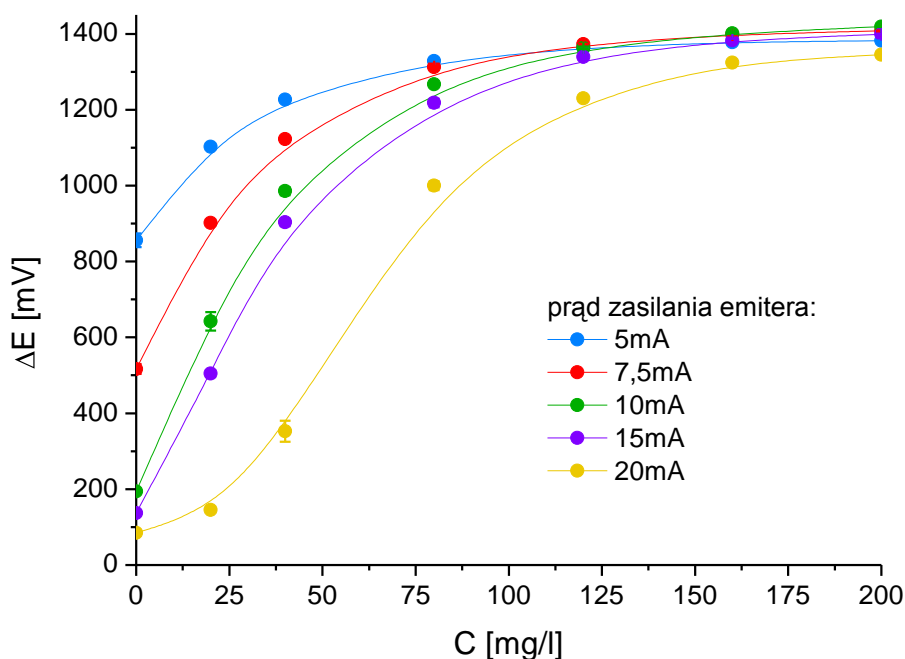
Rysunek 10.7 Schemat budowy nowego fotometrycznego detektora przepływowego PEDD

Układ przepływowy MCFA dedykowany do fotometrycznego oznaczania białka zbudowany został z dwóch zaworów elektromagnetycznych i jednej pompy solenoidowej, pętli zatrzymującej oraz detektora PEDD (rys. 10.8). W pierwszym zaworze próbki białek mieszały się z 8,5% kwasem ortofosforowym. Oba roztwory przez 10s wypełniały pętlę zatrzymującą (800µL), a następnie mieszały się z odczynnikiem Bradford w drugim zaworze. Powstały niebieski produkt był kierowany do detektora. Odpowiednio sterowany pierwszy zawór służył do rozcieńczania roztworów i umożliwiał wykonywanie kalibracji przy użyciu jednego wzorca [80].



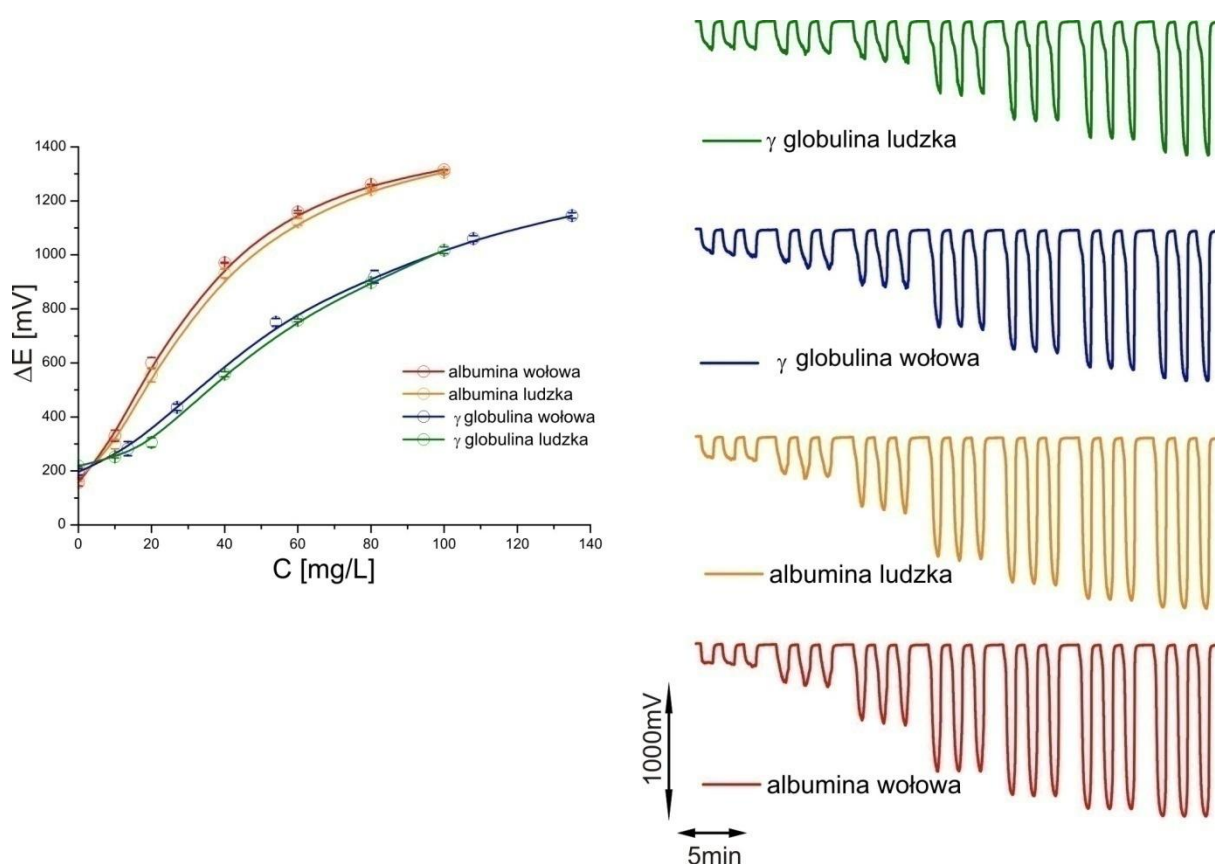
Rysunek 10.8 Schemat układu przepływowego do oznaczeń białka całkowitego metoda Bradford

W ramach optymalizacji pracy układu dobrałam odpowiednie natężenie emisji źródła promieniowania. Jest to istotne ponieważ jak pokazano na rysunku 10.6 już sama kwaśna forma barwnika dosyć silnie absorbuje promieniowanie o długości 595nm. Z kolei zbyt silna emisja będzie przesuwac zakres prostoliniowości w kierunku wyższych stężeń, podnosząc limit detekcji. Przygotowałam roztwór wzorcowy albuminy o stężeniu 200mg/L, który w układzie rozcieńczany był do 20; 40; 80; 120 i 160mg/L. Krzywe kalibracyjne dla takich stężeń zarejestrowałam zasilając źródło prądem o natężeniu: 5; 7,5; 10 i 20mA (rys. 10.9). Jako optymalny prąd zasilania do dalszych badań wybrałam natężenie 15mA.



Rysunek 10.9 Krzywe kalibracyjne otrzymane dla różnych prądów zasilania emitera.

Jak wspomniałam wcześniej, błękit brylantowy wiąże się z zasadowymi i aromatycznymi aminokwasami. Dlatego też peptydy obfitujące w arginę, lizynę, fenyloalaninę, tyrozinę i tryptofan będą tworzyć intensywniej zabarwione roztwory niż te z niższą zawartością wspomnianych aminokwasów. Dlatego wykonałam kalibrację dla dwóch różnych białek: albuminy i globuliny, izolowanych z dwóch różnych źródeł: z ludzkiej i wołowej surowicy krwi. Wyniki tych pomiarów pokazano na rysunku 10.10. Jak widać czułość dla albumin jest nieco wyższa niż dla globulin, można więc spodziewać się błędów systematycznych przy stosowaniu tylko jednego z białek jako wzorca. W zależności od rodzaju próbki należy przygotować jako wzorzec mieszaninę o odpowiednich proporcjach albumin do globuliny (w przypadku analizy surowicy krwi odpowiednio 6:4 [81]). Nie ma natomiast większego znaczenia pochodzenie danego rodzaju białka bowiem krzywe kalibracyjne zarejestrowane dla protein ludzkich i wołowych, znacząco się od siebie nie różnią.



Rysunek 10.10 Przebiegi i krzywe kalibracyjne dla różnych rodzajów białek oznaczanych metodą Bradford

Mimo tych ograniczeń opracowany układ został z powodzeniem użyty do oznaczania całkowitego białka w próbkach ludzkiej surowicy kontrolnej, stosując jako wzorce do kalibracji układu roztwory albuminy i globuliny wołowej w stosunku 6:4. Wyniki oznaczeń okazały się zgodne z wartościami referencyjnymi (tab. 10.1).

Tabela 10.1 Wyniki oznaczeń dla próbek syntetycznych surowic kontrolnych.

Rodzaj surowicy	Stężenie białka certyfikowane	Stężenie białka wyznaczone
	[g/L]	[g/L]
Surowica patologiczna HP	44,0	44,2±0,8
Surowica fizjologiczna HN	67,0	66,0±1,1

10.4 Podsumowanie

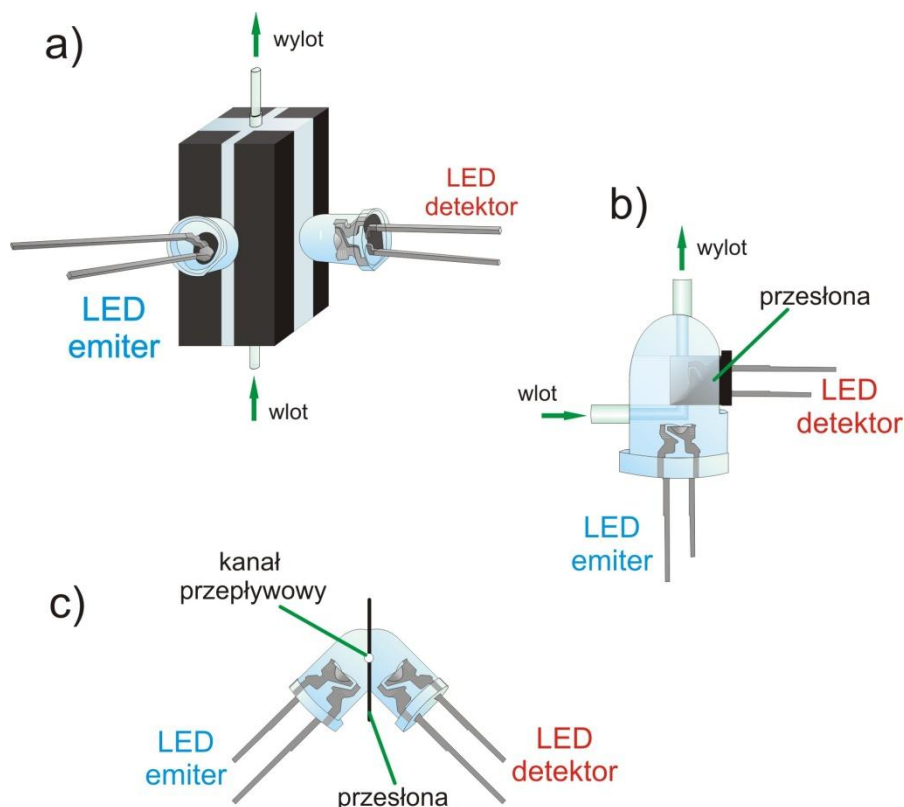
W rozdziałach 7 i 8 przedstawiłam reguły doboru diod elektroluminescencyjnych i metody pomiaru sygnału analitycznego umożliwiające stosowanie PEDDów do badań fotometrycznych. W tym rozdziale na wybranych przykładach pokazałam jak detektor tego typu użyć do pomiarów w warunkach przepływowych. Otrzymane wyniki potwierdziły, że sparowane diody elektroluminescencyjne są wystarczająco czułymi i dynamicznymi detektorami, by móc je z powodzeniem stosować w systemach FIA, gdzie, z natury tej techniki, sygnał analityczny jest niższy i niestacjonarny. Użyteczność ta została potwierdzona w konwencjonalnych układach przepływowych (z użyciem pompy perystaltycznej) jak i układach z przepływem pulsacyjnym bazujących na pompach mikrosolenoidowych. W następnym rozdziale zostaną przedstawione rezultaty analogicznych badań dotyczące fluorymetrycznych detektorów typu PEDD.

11 Fluorymetryczne detektory przepływowe

W poprzednich etapach badań własnych wykazałam, że detektory typu PEDD sprawdzają się zarówno przy pomiarach fotometrycznych (rozdział 8) jak i fluorymetrycznych. Udowodniłam również ich przydatność w oznaczeniach fotometrycznych prowadzonych w warunkach analizy przepływowej. (rozdział 10). W tej części pracy zajęłam się opracowaniem i charakterystyką analityczną przepływowych detektorów fluorymetrycznych konstruowanych przez integrację odpowiednio dobranych diod elektroluminescencyjnych.

11.1 Oznaczanie fluoresceiny

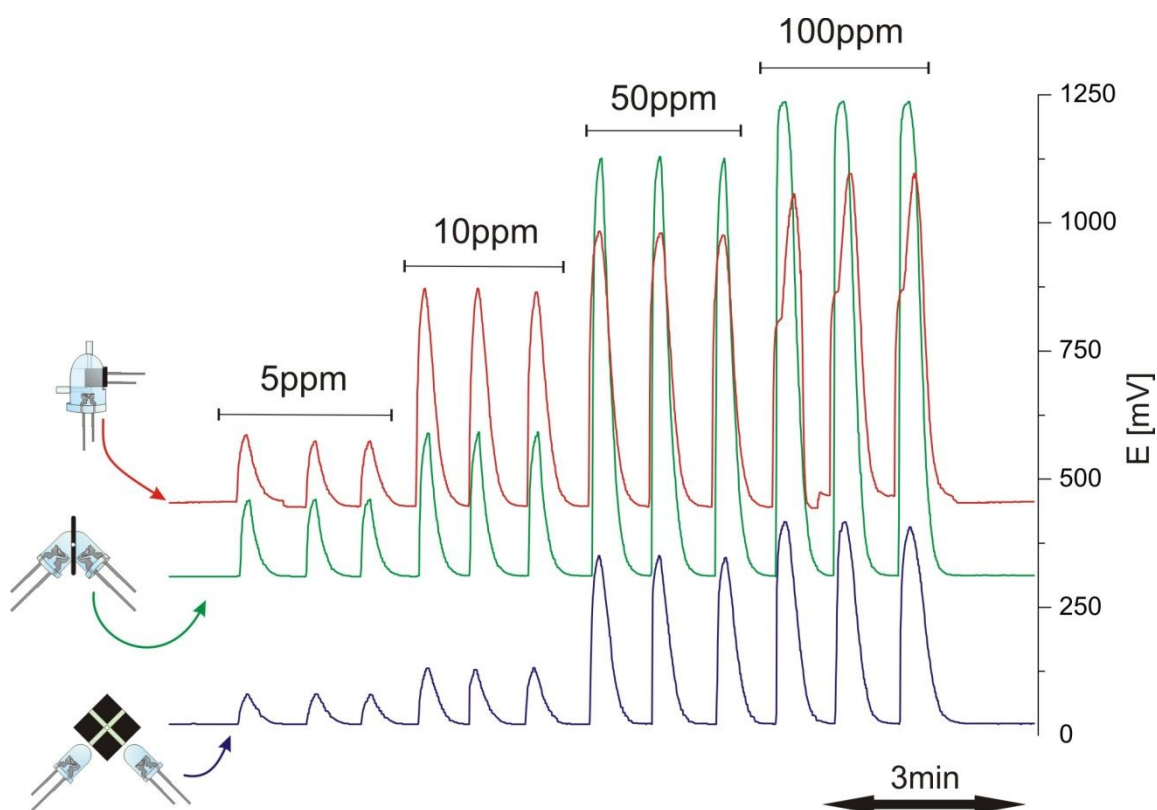
Do badań wstępnych, podobnie jak w przypadku stacjonarnych pomiarów fluorymetrycznych jako modelowy analit wybrałam fluoresceinę. Łatwość jej oznaczania i wysoka wydajność fluorescencji pozwoliły mi w prosty i szybki sposób zbadać i porównać cechy różnych konstrukcji potencjalnego detektora przepływowego PEDD. Zaprojektowałam i wykonałam trzy różne konstrukcje detektora przepływowego przedstawione na rys. 11.1.



Rysunek 11.1 Różne konstrukcje fluorymetrycznych detektorów przepływowych typu PEDD.

Pierwszy wariant zakładał integrację detektora i emitera LED z konwencjonalnym naczyniem przepływowym do fluorymetrii (rys. 11.1.a). W drugim wariantcie zastosowałam emiter o 10mm średnicy klosza i 5mm detektor. W kloszu źródła wywierciłam 5mm otwór do którego wkleiłam owiniętą w czarną koszulkę termokurczliwą detektor, a następnie wywierciłam dwa prostopadłe kanały (rys. 11.1.b). W trzecim wariantcie spiłowałam powierzchnię kloszy dwóch 5mm diod pod kątem 45 stopni. Skleiłam je umieszczając między nimi czarną plastikową przesłonę, a następnie wywierciłam 0,8mm kanał, przez który przewlekłam wężyk teflonowy (rys. 11.1.c).

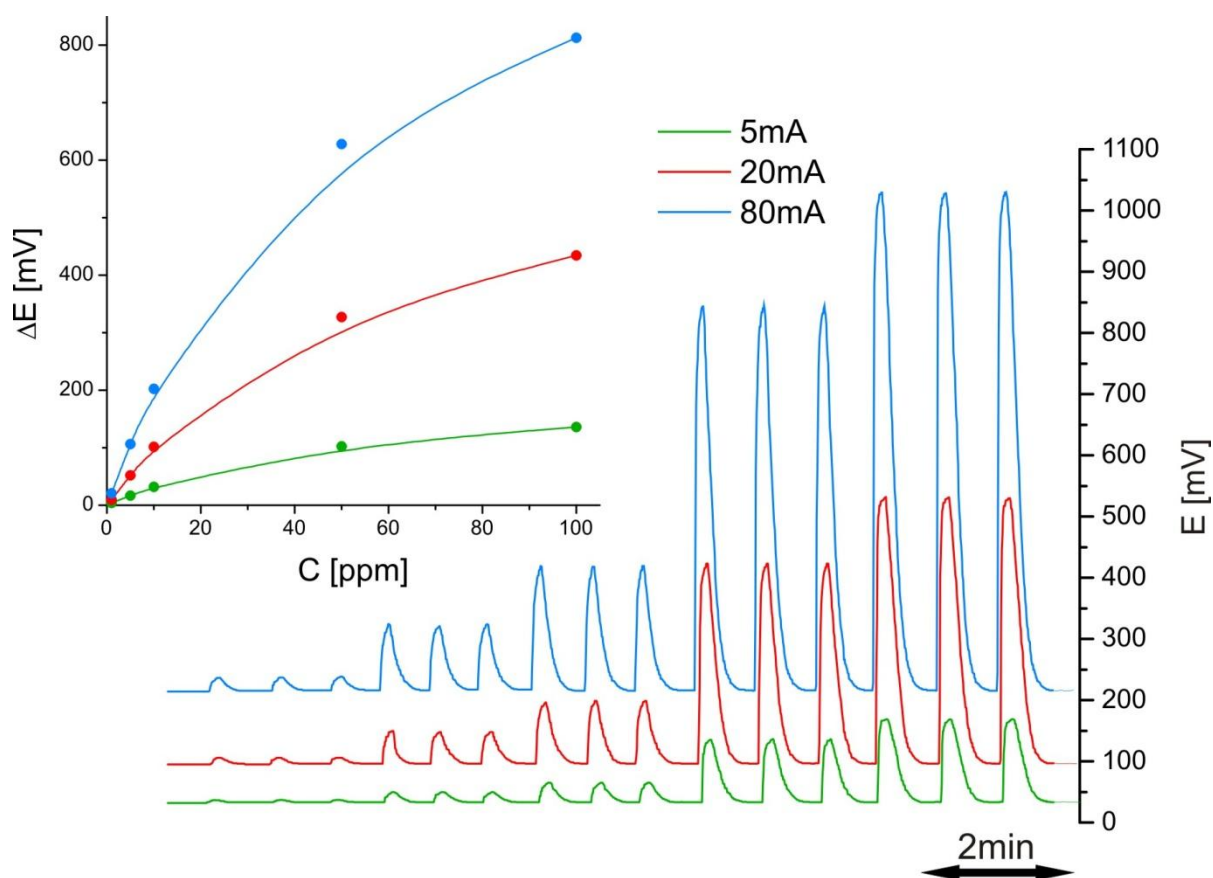
Wszystkie detektory testowałam w prostym trójelementowym (pompa, zawór, detektor), jednokanałowym układzie przepływowym, do którego wstrzykiwałam wzorce fluoresceiny o stężeniach 5; 10; 50 i 100ppm. Diodę emiter zasilalam prądem o natężeniu 80mA. Otrzymane przebiegi prezentuję na rysunku 11.2.



Rysunek 11.2 Przebiegi kalibracji fluoresceiny przeprowadzone na 3 różnych konstrukcjach detektora PEDD

We wszystkich przypadkach otrzymane przebiegi charakteryzują się dużą stabilnością linii podstawowej i zadowalającą odtwarzalnością sygnałów. Jak widać oznaczenia prowadzone za pomocą zintegrowanych detektorów, charakteryzują się znacznie

większą czułością, niż ma to miejsce w przypadku konwencjonalnego naczynia przepływowego z diodami. Z drugiej strony ingerencja w konstrukcję klosza może mieć również negatywne skutki co widać na przebiegu dla drugiej wersji detektora. Deformacje pików prawdopodobnie związane są ze specyficznym rozproszeniem światła wewnątrz klosza większej diody emitera. Innym negatywnym zjawiskiem obserwowanym w zintegrowanych detektorach jest podnoszenie się linii podstawowej związane z docieraniem do detektora części promieniowania wzbudzającego. W przypadku wariantu C detektora jest to jednak efekt znacznie słabszy niż ten związany ze wzmocnieniem sygnału, stąd też detektor ten charakteryzuje się największą czułością i tę wersję detektora wybrałam do dalszych badań.



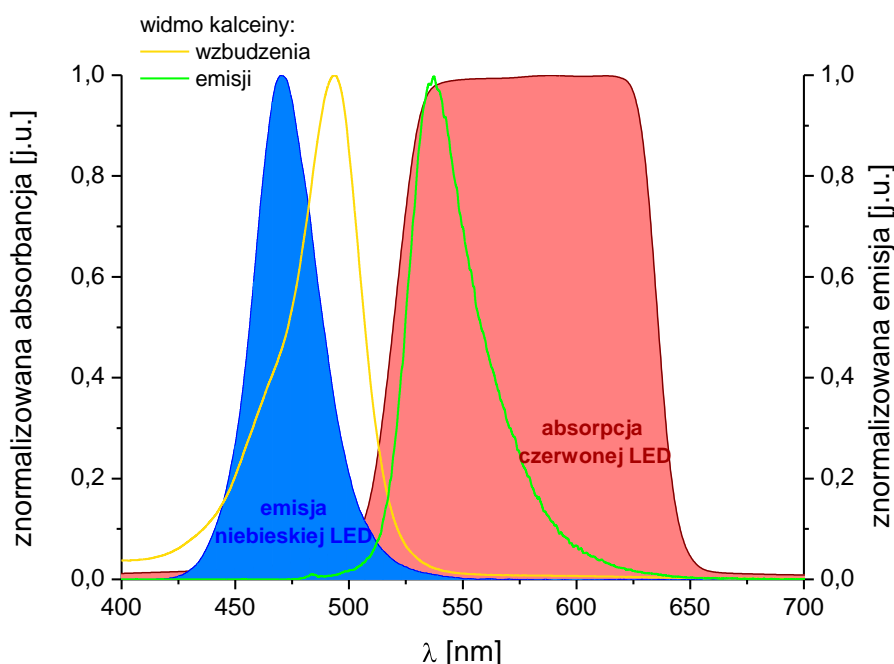
Rysunek 11.3 Krzywe kalibracyjne fluoresceiny dla różnych wartości prądów zasilania emitera.

Podczas stacjonarnych pomiarów fluorymetrycznych zaobserwowałam, że zwiększenie intensywności emisji źródła automatycznie poprawia czułość oznaczeń (rys. 9.3). Ponieważ ze względu na wybraną konstrukcję naczynia przepływowego, część promieniowania wzbudzającego dociera do diody detektora, postanowiłam sprawdzić jak będą wyglądały przebiegi dla niższych prądów zasilania źródła. Jak widać na rysunku 10.3,

zmniejszenie intensywności emisji źródła przez obniżenie prądu zasilania powoduje obniżenie sygnału dla linii podstawowej, jednak wiąże się również ze znacznym pogorszeniem czułości. Dlatego też, tak jak w przypadku pomiarów stacjonarnych (rozdział 9) postanowiłam prowadzić pomiary przy największym możliwym prądzie zasilania źródła.

11.2 Oznaczanie wapnia w postaci kompleksu z kalceiną

Jedną z najpopularniejszych metod oznaczania jonów wapnia jest reakcja tworzenia fluoryzujących kompleksów z kalceiną. Reakcje tę wykorzystuje się zarówno przy wyznaczaniu punktu końcowego miareczkowania jonów wapnia za pomocą EDTA w obecności jonów magnezu [82], jak i do bezpośredniej fluorymetrycznej detekcji [83]. Reakcja jest łatwo adaptowalna do technik przepływowych [84], mikroprzepływowych [85], była także stosowana w sensorach optycznych [86].

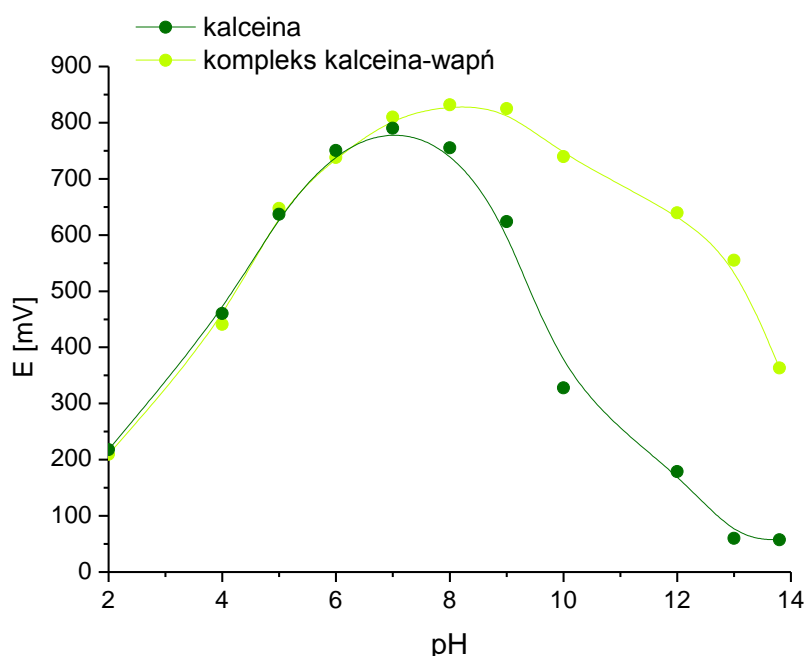


Rysunek 11.4 Widma wzbudzenia i emisji kompleksu kalceina- wapń oraz zakres emisji niebieskiej i czułości spektralnej czerwonej LED.

Kalceina, podobnie jak jej kompleks z wapniem, jest substancją o właściwościach spektralnych bardzo podobnych do fluoresceiny. Jej maksimum wzbudzenia przypada na 490nm a emisji 535nm (rys. 11.4.). Można więc oznaczać ją przy użyciu identycznego detektora jak ten opracowany wcześniej do oznaczeń fluoresceiny. Z drugiej strony za

pomocą tej konstrukcji można oznaczać wapń, analit o większym znaczeniu niż modelowa fluoresceina, a więc znacznie lepiej nadaje się do praktycznego przetestowania możliwości przepływowego fluorymetrycznego detektora PEDD.

Kalceina zarówno w postaci wolnego ligandu, jak i kompleksów, jest silnym fluoroforem, dlatego aby móc fluorymetrycznie za jej pomocą oznaczać jony wapnia, należy najpierw odpowiednio dobrać warunki oznaczenia. W tym celu przygotowałam serię buforów o pH od 2 do 13, takich samych jak podczas wyznaczania pKa barwników (rozdział 8.4.2) i mierzyłam fluorescencję 50ppm roztworu kalceiny bez i w obecności 0,1mM jonów wapnia. Wyniki tego eksperymentu przedstawiam na rysunku 11.5.

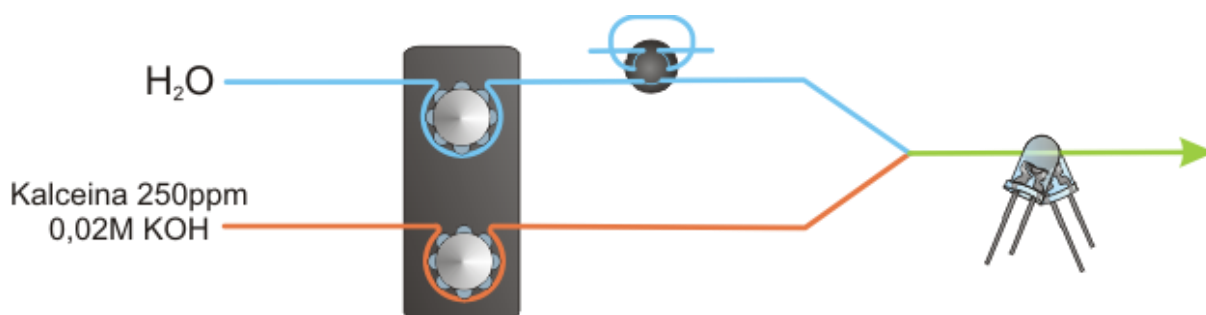


Rysunek 11.5 Zależność intensywności fluorescencji kalceiny i kompleksu kalceina- wapń od pH.

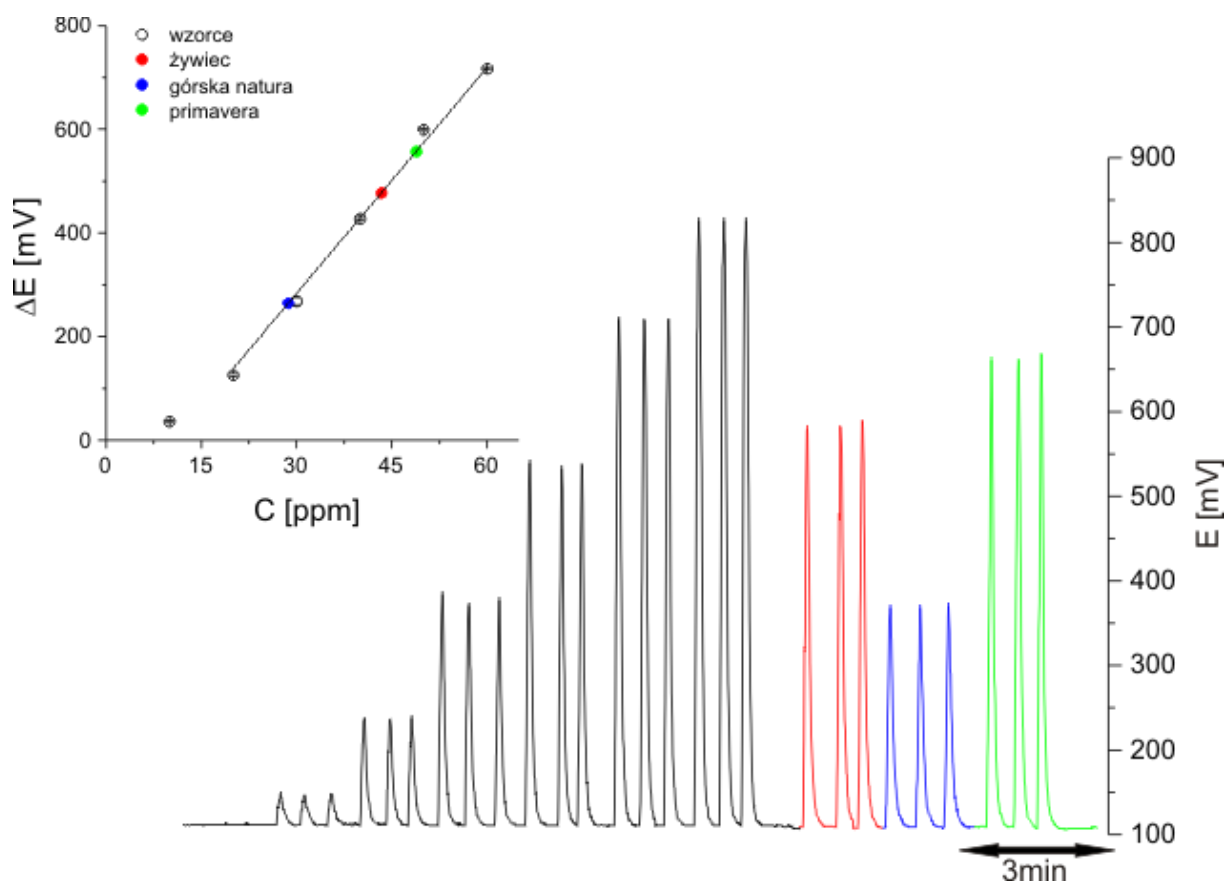
Maksymalną emisję kalceina oraz jej kompleks z wapniem wykazują przy pH 7-8. Wraz z alkalizacją środowiska obserwuje się spadek intensywności fluorescencji, przy czym znacznie szybciej tłumiona jest fluorescencja wolnej kalceiny. Największą różnicę w intensywności emisji czystego związku i kompleksu z wapniem przypada na pH ok. 12. Z tego powodu dalsze oznaczenia prowadziłam w środowisku 0,01M KOH.

Do oznaczeń wapnia skonstruowałam prosty dwukanałowy układ przepływowy. Wzorce wapnia były wstrzykiwane w strumień wody. Osobnym kanałem pompowany był 250ppm roztwór kalceiny w 0,02M KOH. Obydwa roztwory łączyły się w trójniku i powstały

kompleks kalceina- wapń kierowany był do detektora PEDD (rys. 11.6). Układ ten posłużył mi do oznaczeń jonów wapnia w próbkach rzeczywistych- trzech rodzajach wód mineralnych (rys. 11.7). Wiarygodność otrzymanych wyników (tab. 11.1) potwierdziłam porównując otrzymane wartości z zawartością Ca^{2+} deklarowaną przez producenta oraz przeprowadzając pomiary referencyjne (miareczkowanie roztworem EDTA w obecności mureksydu [87]).



Rysunek 11.6 Schemat układu przepływowego do fluorymetrycznego oznaczania jonów wapnia

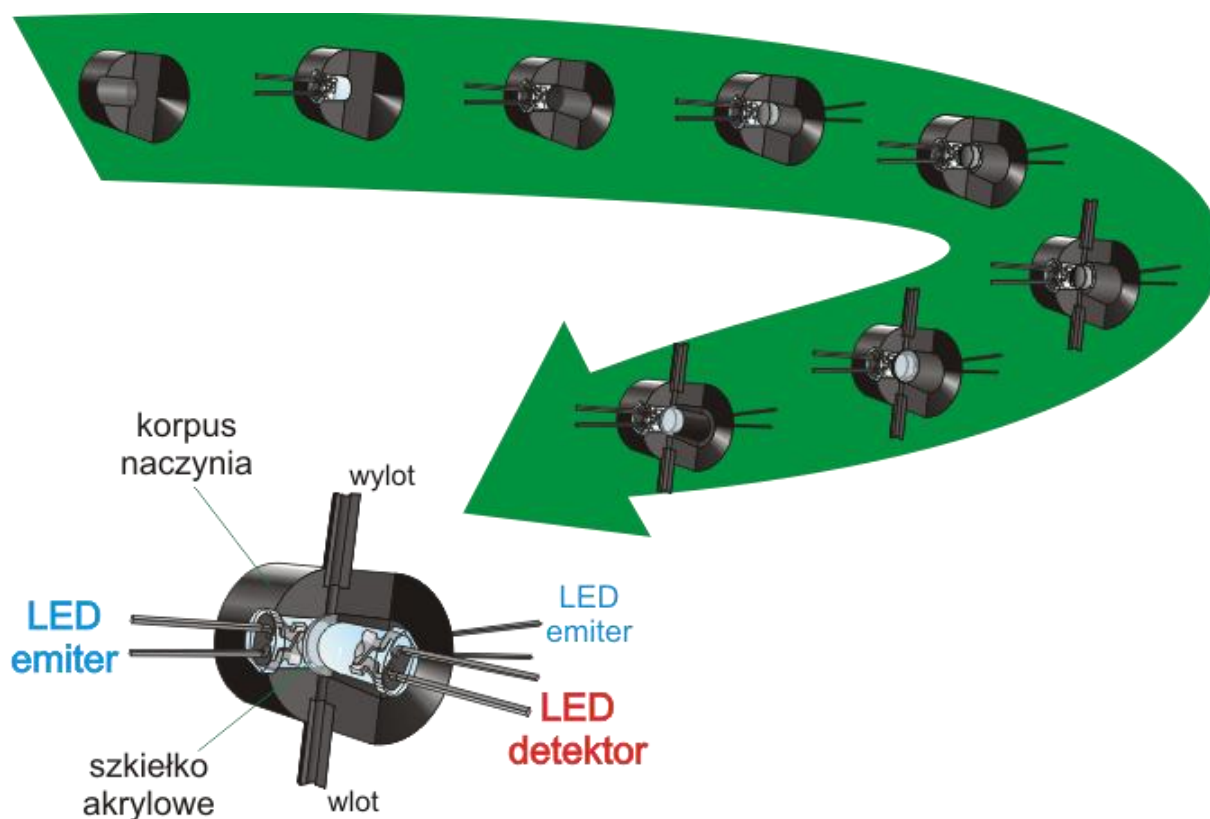


Rysunek 11.7 Fluorymetryczne oznaczanie jonów wapnia w próbkach wód mineralnych

Tabela 11.1 Wyniki oznaczeń próbek wód mineralnych

Próbka	Zawartość jonów Ca^{2+} [ppm]		
	deklarowana	oznaczona kompleksometrycznie	oznaczona za pomocą detektora PEDD
Żywiec	42,6	41,7±0,1	43,3±0,2
Górska Natura	25,3	26,1±0,1	28,7±0,0
Primavera	48,1	47,3±0,2	48,8±0,1

Przedstawiony fluorymetryczny detektor PEDD mimo prostej budowy charakteryzuje się dużą czułością i powtarzalnością oraz pozwala na otrzymywanie dokładnych i precyzyjnych wyników. Jednak mimo zadowalających rezultatów postanowiłam sprawdzić również inną konstrukcję detektora. Ponieważ wcześniejsze pomiary wykazały, że ze wzrostem intensywności promieniowania wzbudzającego zwiększa się wydajność fluorescencji, a tym samym czułość oznaczeń, nowa koncepcja zakładała zastosowanie dwóch źródeł promieniowania. Budowa detektora była podobna do tej prezentowanej w rozdziale 10.3.

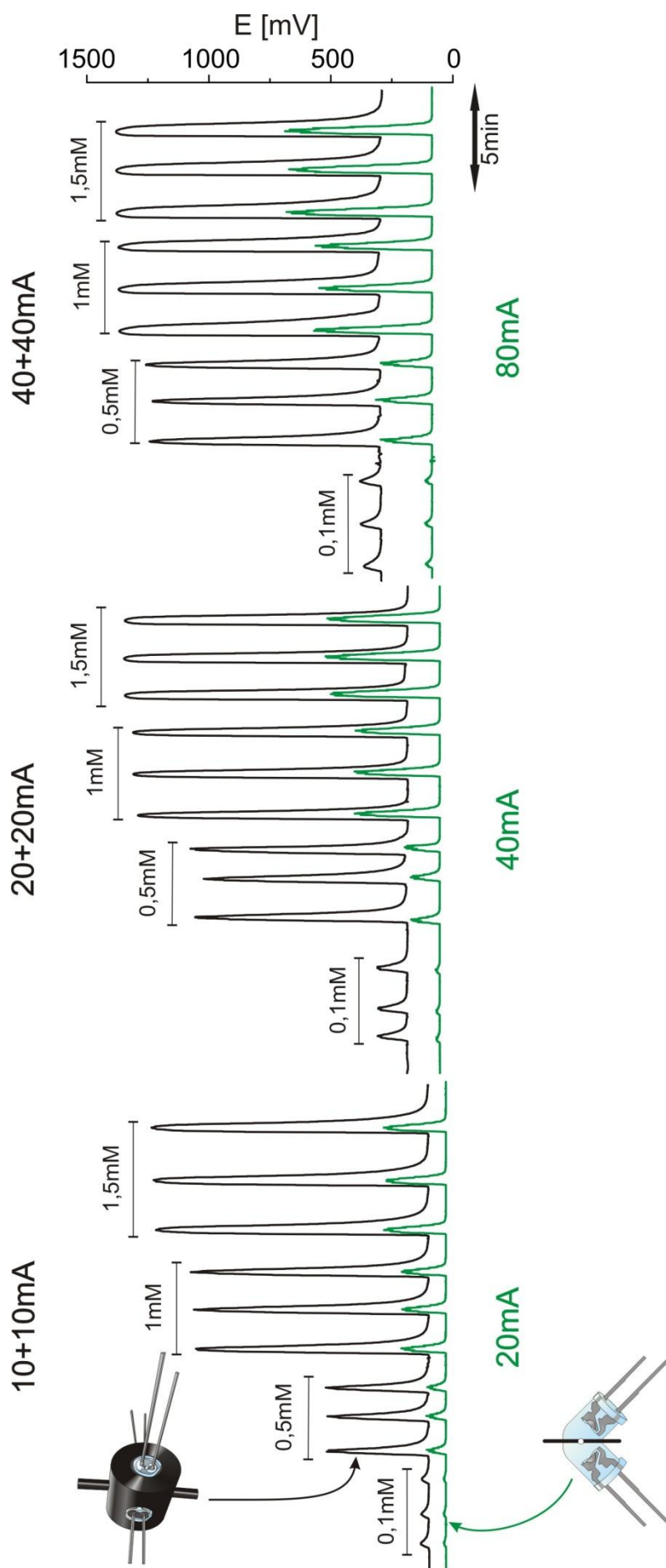


Rysunek 11.8 Schemat budowy fluorymetrycznego przepływowego detektora PEDD z podwójnym emiterem.

W cylindrycznego bloku ertacetalu wywierciłam na środku wysokości poprzeczny otwór o średnicy 4,9mm w którym umieściłam kolejno dwie diody elektroluminescencyjne mające pełnić funkcje źródeł promieniowania. Tak jak wcześniej w centralnym punkcie podstawy wywierciłam podłużny kanał, tym razem o średnicy 5mm, który również poszerzyłam na obrzeżach do 7mm. Ponownie przez środek wywierciłam 1mm poprzeczny otwór, do umieszczenia wlotowej i wylotowej panewki, a w poszerzonych otworach umieściłam szkiełka akrylowe, które docisnęłam i przytwierdziłam pierścieniami z Ertacetalu®. Kolejne etapy tego procesu oraz gotowe detektor widać ilustruje rysunek 11.8.

Otrzymany w ten sposób detektor umieściłam w układzie przepływowym tuż za „starym” detektorem PEDD i rejestrowałam dla obydwu jednocześnie przebiegi kalibracji, dla różnych prądów zasilania emiterów. Dokonałam również pewnej zmiany w składzie odczynnika kompleksującego. Aby upewnić się, że sygnał fluorymetryczny pochodzi wyłącznie od jonów wapnia, zwiększyłam stężenie KOH do 2M, tak aby wytrącić jony Mg^{2+} , które również mogą tworzyć fluoryzujące kompleksy z kalceiną. W związku z tym w kolejnych pomiarach otrzymałam nieznacznie mniejszą czułość oznaczeń w porównaniu do poprzednich- rys. 11.7. Pomiar był prowadzony tak, żeby sumaryczne natężenie prądów zasilania emiterów było równe na obu detektorach. Rezultaty tego eksperymentu przedstawia rysunek 11.9.

Nowa konstrukcja, w której zastosowałam dwa źródła promieniowania pozwala na uzyskanie znacznie większej czułości oznaczeń. Wynika to z faktu, że zależność intensywności emisji od natężenia prądu zasilającego ma raczej logarytmiczny charakter i dla prądów powyżej 20mA nie obserwuje się już tak wysokiego wzrostu intensywności emisji źródła. Stąd też dwa źródła zasilane połowę mniejszym natężeniem pozwalają osiągnąć znacznie większą światłość. Większą czułość uzyskuje się kosztem mniejszej przepustowości układu. Ze względu na większą objętość martwą wytworzonej celi przepływowej, sygnał w nowym detektorze wolniej wraca do poziomu linii podstawowej. W związku z tym stosując konstrukcję dwudiodową można wykonać 80 wstrzyków na godzinę, natomiast konstrukcja trójdiadowa pozwala na 60 wstrzyków w tym czasie.



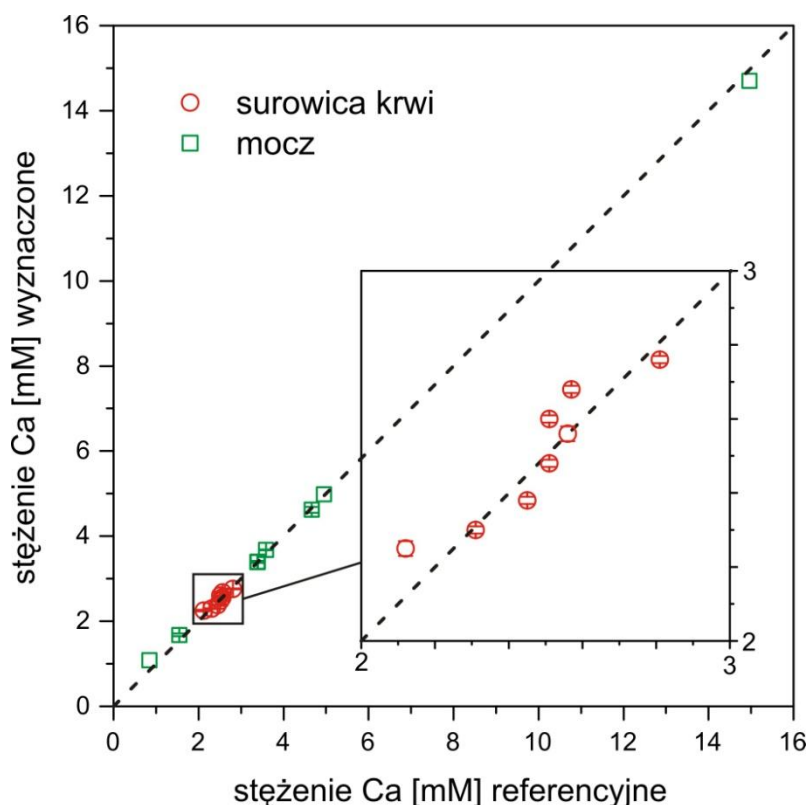
Rysunek 11.9 Przebieg kalibracji wapnia przeprowadzony dla różnych prądów zasilania emiterów na nowym i starym detektorze.

Tabela 11.2 Wyniki fluorymetrycznych oznaczeń wapnia w próbkach wód mineralnych.

Próbka	Zawartość jonów Ca^{2+} [ppm]		
	deklarowana	referencyjna	wyznaczona
Żywiec Zdrój	42,6	42,7±0,4	40,0±0,8
Kropla Beskidu	44,1	48,7±0,5	48,9±0,9
Nałęczowianka	110,2	111,3±1,1	110,0±1,3
Cisowianka	131,3	131,7±1,4	129,3±3,9
Muszynianka	180,9	178,8±1,6	181,6±3,7

Tabela 11.3 Wyniki fluorymetrycznych oznaczeń wapnia w próbkach farmaceutyków.

Próbka	Główne składniki	Zawartość jonów Ca^{2+}		
		deklarowana	referencyjna	wyznaczona
Płyn fizjologiczny	elektrolity	80mg/L	84,0±3,2 mg/L	88,0±0,8 mg/L
Roztwór Ringera	elektrolity	88mg/L	88,8±0,8 mg/L	88,0±0,8 mg/L
Sanosvit Calcium <i>syrop</i>	glukonolaktobionian wapnia, węglan wapnia	22,8 mg/mL	22,6±0,2 mg/mL	23,2±0,1 mg/mL
Calcium Gluconicum <i>tabletki</i>	glukonian wapnia	45 mg/ tab	43,5±0,4 mg/ tab	43,0±0,4 mg/ tab
Calcium Pliva <i>tabletki musujące</i>	mleczan wapnia	177 mg/tab	176,0±1,6 mg/ tab	174,0±1,6 mg/ tab
Calcium Polfa <i>tabletki musujące</i>	mleczan wapnia	180 mg/tab	180,6±1,6 mg/tab	178,9±1,7 mg/tab
Calcium Sandoz forte <i>tabletki musujące</i>	laktogluconian wapnia, węglan wapnia	500 mg/ tab	503,4±4,9 mg/ tab	505,3±0,2 mg/ tab
Calcium z Vit. C forte <i>tabletki musujące</i>	kwask askorbinowy, węglan wapnia	300 mg/ tab	299,8±1,4 mg/ tab	299,8±0,3 mg/ tab
Rutokal C plus <i>tabletki musujące</i>	kwask askorbinowy, rutyna, węglan wapnia	100 mg/ tab	100,2±1,2 mg/ tab	100,6±0,1 mg/ tab
Zdrovit Alercal <i>tabletki musujące</i>	kwercytyna, węglan wapnia	300 mg/ tab	300,3±1,6 mg/ tab	294,7±0,3 mg/ tab



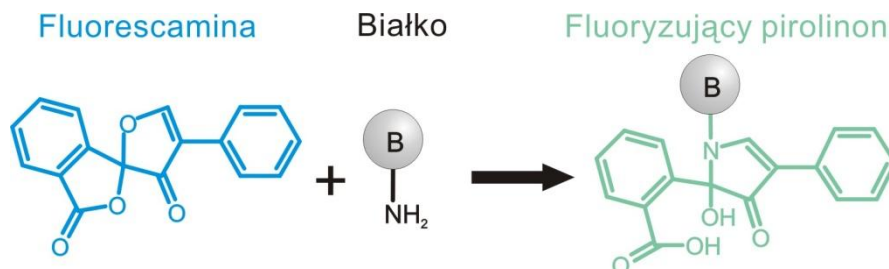
Rysunek 11.10 Wyniki oznaczeń wapnia w płynach fizjologicznych (odchylenie standardowe dla 3 prób).

Układ przepływowy z nowym detektorem fluorymetrycznym PEDD został zastosowany do oznaczeń jonów wapnia w różnych rodzajach próbek rzeczywistych: wód mineralnych, farmaceutyków oraz w próbkach płynów fizjologicznych. Oznaczenia referencyjne dla próbek wód i leków wykonane były tak jak poprzednio (miareczkowanie kompleksometryczne z EDTA w obecności mureksydu [87]), natomiast próbki biologiczne – powszechnie stosowaną w laboratoriach klinicznych metodą CPC (fotometryczne oznaczanie kompleksu wapnia i o-krezoloftaleiny [88]). Otrzymane wyniki prezentuję w tabelach 11.2 i 11.3 i na wykresie 11.10. Również w tym przypadku otrzymane wartości są zgodne z deklarowanymi wyznaczonymi referencyjnie zawartościami jonów wapnia w próbkach.

Powyższe wyniki są kolejnym potwierdzeniem użyteczności analitycznej prezentowanego fluorymetrycznego detektora przepływowego. Nawet dla próbek o złożonej matrycy takich jak płyny fizjologiczne (mocz i surowica) udało się uzyskać bardzo wysoką wartość współczynnika korelacji między wartościami wyznaczonymi i referencyjnymi ($R^2=0,9994$).

11.3 Oznaczanie białka całkowitego

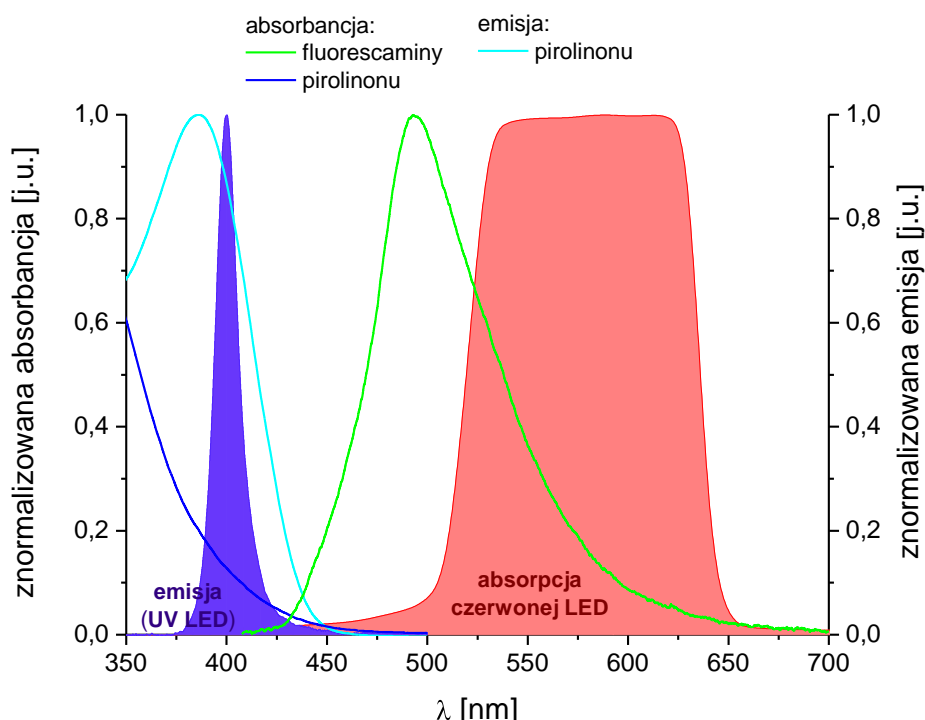
Do ostatniej weryfikacji eksperymentalnej użyteczności analitycznej fluorymetrycznego detektora przepływowego PEDD postanowiłam zastosować bardziej złożoną metodę analityczną, zarówno pod względem budowy układu przepływowego jak i składu oznaczanej substancji. Jako cel postawiłam fluorymetryczne oznaczanie białka całkowitego za pomocą fluorescaminy [89]. Jest to jedna z najpopularniejszych fluorymetrycznych metod detekcji białek, obok reakcji z różem bengalskim [90] i błękitem albuminowym AB-580 [91]. Podstawą tego oznaczenia jest reakcja niefluoryzującej fluorescaminy z wolnymi pierwszorzędowymi grupami aminowymi białek, w wyniku której powstają fluoryzujące pochodne pirolinonowe (rys. 11.11). Ponieważ aminy muszą być zdeprotonowane, reakcja przebiega w pH powyżej 9. Dodatkowo ze względu na niespecyficzność reakcji należy używać buforów nie zawierających amin pierwszorzędowych, takich jak TRIS albo glicyna. Optymalne środowisko reakcji można osiągnąć stosując bufor boranowy. Ponadto ze względu na szybką hydrolizę fluorescaminy w wodzie, musi ona być rozpuszczona w rozpuszczalnikach aprotycznych. W moich badaniach zastosowałam aceton.



Rysunek 11.11 Schemat reakcji fluorescaminy z białkiem.

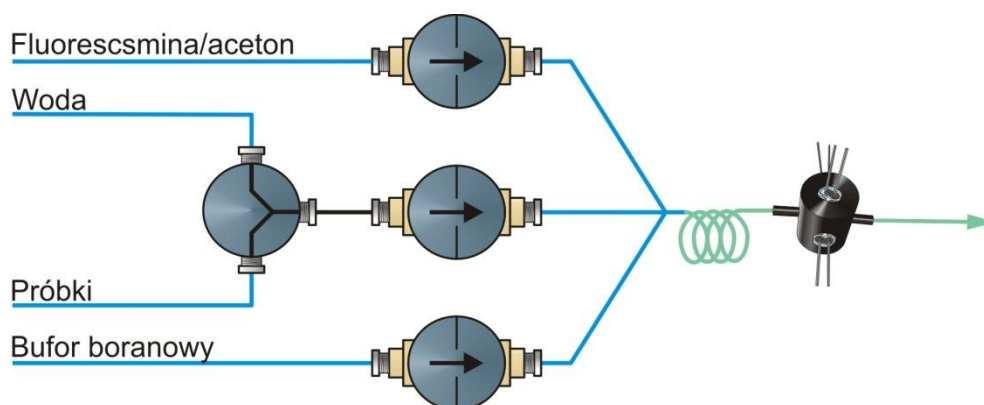
Fluorescencja pirolinonów wzbudzana jest promieniowaniem UV o długości fali ok. 390nm emitując przy tym światło niebieskie ($\lambda_{\text{max}}=500\text{nm}$). Z widmem wzbudzenia dosyć dobrze korelują widma emisyjne diod fioletowych o maksimum emisji przy 405nm, natomiast najlepszym detektorem okazała się dioda czerwona (rys. 11.12). Zgodnie z danymi z rysunku 6.7 lepszą korelację widm absorpcji diody z widmem emisji pirolinonu otrzymuje się dla żółtego i pomarańczowego detektora LED. Jednak w toku badań wstępnych okazało się, że otrzymane za ich pomocą krzywe kalibracyjne mają o 50% mniejszą czułość niż krzywe zarejestrowane z wykorzystaniem czerwonej 7Cd diody LED. Dlatego też w skład detektora przepływowego, przeznaczonego do fluorymetrycznej detekcji białka zbudowanego zgodnie

ze schematem pokazanym na rysunku 11.8, wchodziły dwie fioletowe LED pełniące funkcje źródła oraz jedna czerwona jako detektor fluorescencji.



Rysunek 11.12 Widma absorpcji fluorescaminy i pirolinonów, emisji pirolinonów oraz zakresy emisji diody UV i czułości spektralnej diody czerwonej.

Podobnie jak w przypadku fotometrycznych oznaczeń białka (rozdział 10.3) do oznaczeń wykorzystałam technikę z przepływem pulsacyjnym. Tym razem była to jednak metoda MPFA (Multi Pumping Flow Analysis). W skład układu wchodziły: zawór elektromagnetyczny, trzy pompy solenoidowe, czwórnik, pętla mieszająca oraz detektor przepływowy PEDD (rys. 11.13).

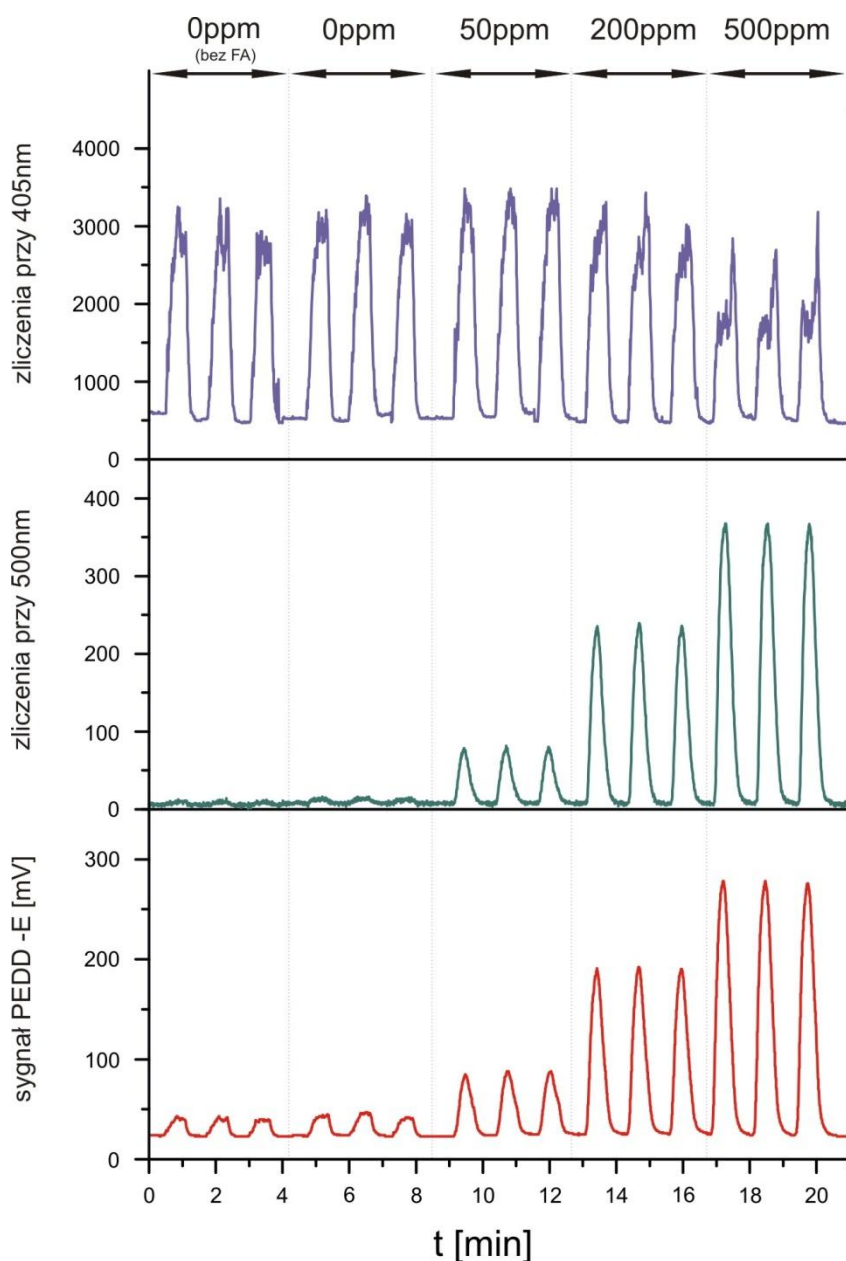


Rysunek 11.13 Konstrukcja układu przepływowego MPFA do fluorymetrycznego oznaczania białka całkowitego

Zawór elektromagnetyczny w połączeniu z jedną z pomp został zastosowany do wprowadzenia próbki oraz przygotowania serii wzorców kalibracyjnych z jednego roztworu [80]. Dwie kolejne pompy dostarczały 0,05M bufor boranowy o pH 10 i acetonowy roztwór fluorescaminy o stężeniu 400mg/L. Aby zmniejszyć zużycie reagentów segment fluorescaminy był pompowany równocześnie z segmentem wzorca/próbki.

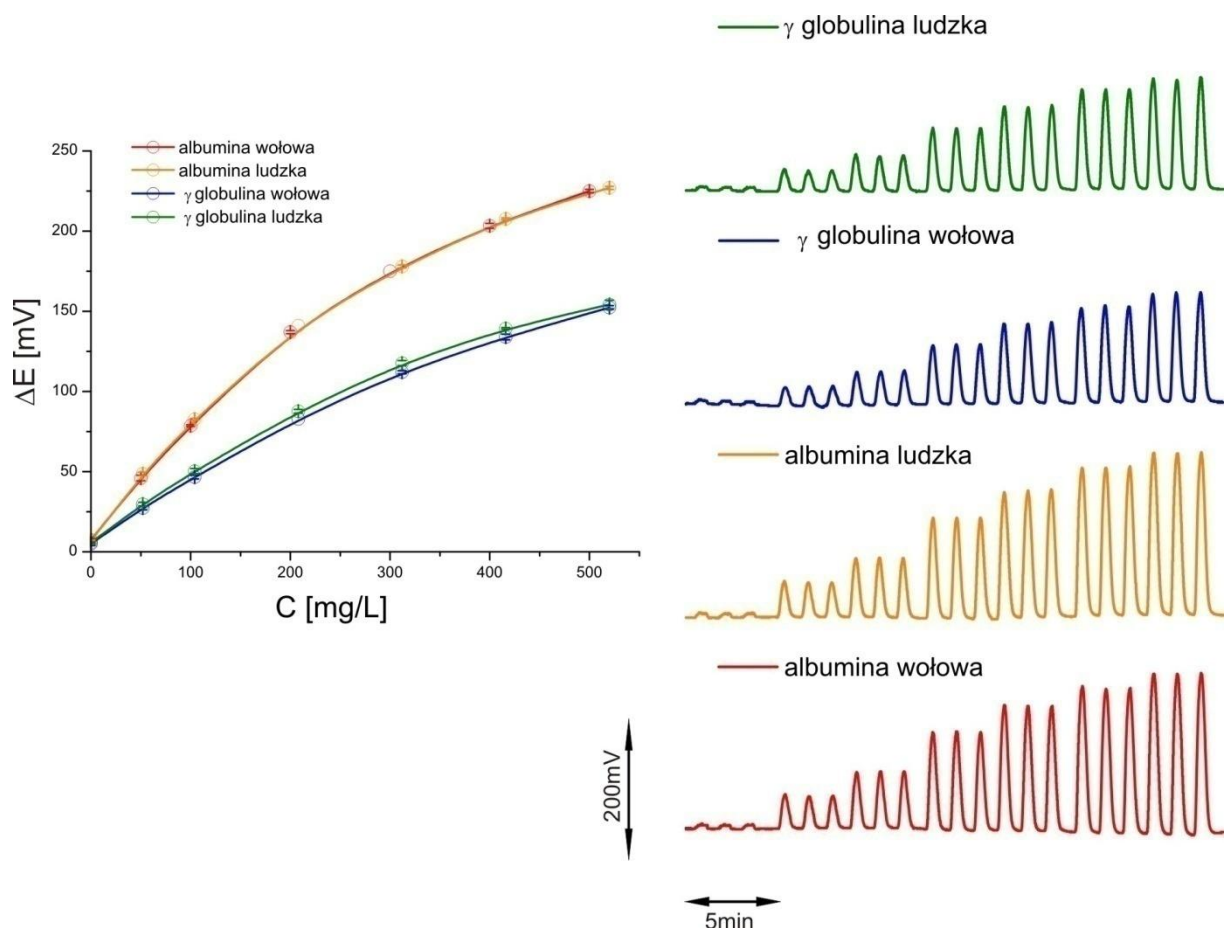
Mieszanie się w czwórniku roztworów wodnych z acetonem pociąga za sobą pewne konsekwencje. Chodzi m.in. o tzw. *Schlieren effect*. Jest to zjawisko polegające na załamaniu wiązki światła ze względu na niejednorodność optyczną transparentnego materiału. Ma to miejsce szczególnie na granicach faz o różnych stężeniach, bądź, jak to ma miejsce w tym przypadku, o różnym współczynniku załamania światła. W rezultacie część promieniowania emitowanego przez źródło może być kierowana bezpośrednio do detektora, co może być powodem poważnych interferencji spektralnych. Aby sprawdzić ten efekt na wprost czerwonej LED - detektora podłączyłam za pomocą światłowodów spektrofotometryczny detektor CCD (Ocean Optics) rejestrując przebieg kalibracji przy długości fali emisji diody wzbudzającej - 405nm i długości fali emisji pirolinonu. Równocześnie rejestrowałam sygnał wygenerowany na czerwonej diodzie elektroluminescencyjnej. Rezultaty tego eksperymentu pokazano na rysunku 11.14.

Pierwsze trzy piki zostały zarejestrowane gdy przez układ płynął czysty aceton, następne trzy dla acetonu z fluorescaminą, zaś w kolejnych rosnące stężenia białka. Jak widać na wykresach docierające do detektora promieniowanie diody emitera (405nm) jest ok. 10 razy bardziej intensywne niż to emitowane przez fluoryzujący produkt reakcji (1. i 2. przebieg na rys. 11.14). Widać również spadek intensywności rozproszonego promieniowania detektora przy większych stężeniach analitu, co wynika z większej absorbancji roztworu. Tymczasem na przebiegach zarejestrowanych za pomocą czerwonej diody elektroluminescencyjnej, co prawda pojawiają się sygnały dla niefluoryzujących roztworów, spowodowane szczątkową czułością detektora na emitowane przez źródło promieniowanie, jednak nie przeszkadzają one w zarejestrowaniu prawidłowej zależności kalibracyjnej. Jest to kolejny przykład pomiarów, w których selektywność detektora odgrywa kluczową rolę i które pokazują przewagę diody elektroluminescencyjnej nad innymi nieselektywnymi detektorami promieniowania.



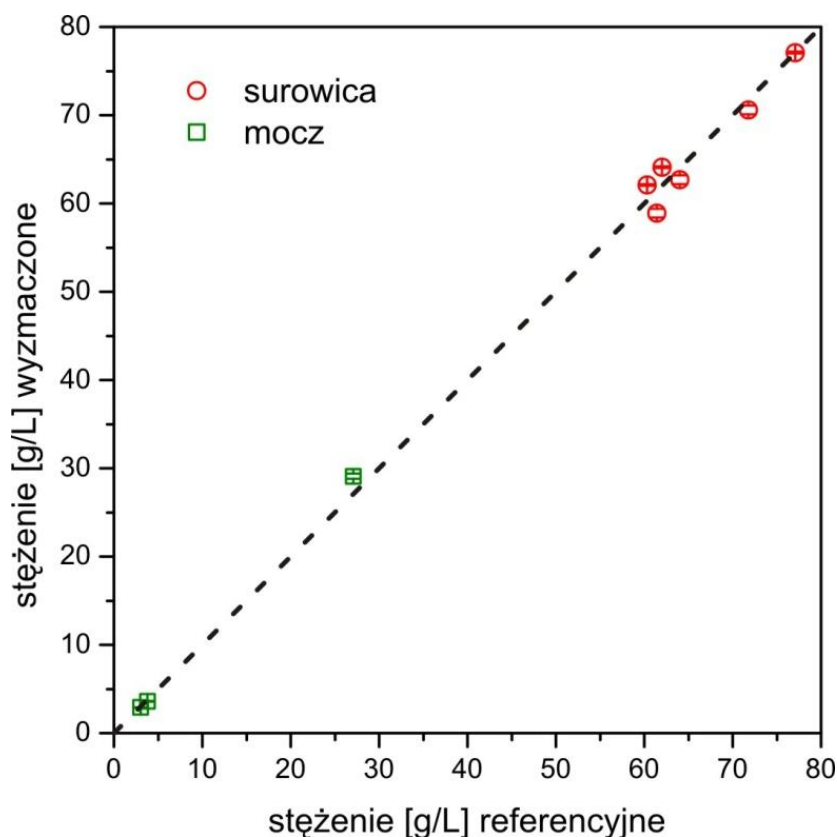
Rysunek 11.14 Porównanie sygnałów zarejestrowanych detektorem CCD przy długości fali emisji diody wzbudzającej oraz pirolinonu, z sygnałem zarejestrowanym za pomocą czerwonej diody jako detektora.

Ponieważ fluorescamina reaguje z aminokwasami zawierającymi pierwszorzędowe grupy aminowe, np. lizyną oraz N- terminalnymi aminokwasami, podobnie jak w przypadku oznaczeń fotometrycznych (rys. 10.10) i w tej metodzie mogą wystąpić różnice w sygnale otrzymywanym dla różnych rodzajów białek. Dlatego również w tym przypadku, wykonałam kalibrację dla albuminy i globuliny wyizolowanych z surowic krwi wołowej i ludzkiej (rys. 11.15). Tak samo jak przy oznaczeniach metoda Bradford (rozdział 10.3) wyższe sygnały otrzymywane są dla białek z grupy albumin, nie ma również znaczącej różnicy między tymi samymi rodzajami białka pochodzącymi z różnych źródeł.



Rysunek 11.15 Przebiegi i krzywe kalibracyjne prowadzone dla różnych rodzajów białek.

Po zoptymalizowaniu warunków reakcji, zastosowałam opracowany detektor i układ przepływowy do oznaczania białka w próbkach klinicznych: moczu i surowicy krwi. Badane próbki były wcześniej przeanalizowane w laboratorium klinicznym Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego (metoda biuretowa). Próbkę surowicy były rozcieńczone 200-krotnie. Ze względu na ich złożony skład, jako wzorzec kalibracyjny zastosowałam rozcieńczone surowice kontrolne. Próbkę moczu rozcieńczyłam 5- lub 50-krotnie zaś do wykonania roztworów wzorcowych użyłam albuminę wołową, ponieważ albumina jest dominującą frakcją białkową występującą w moczu. Rezultaty tych analiz przedstawiam na rysunku 11.16. Uzyskane wyniki, nie różnią się znacząco od tych otrzymanych w toku rutynowych oznaczeń metoda referencyjną, co potwierdza użyteczność analityczną opracowanego systemu.



Rysunek 11.16 Korelacje wyników oznaczeń białka w próbkach klinicznych za pomocą detektora PEDD i metodą referencyjną (odchylenie standardowe dla 3 prób).

11.4 Podsumowanie

W tym rozdziale pracy przedstawiono różnorodne konstrukcje zintegrowanych diod elektroluminescencyjnych przeznaczonych do pomiarów fluorymetrycznych w warunkach przepływowych. Najlepsze rozwiązania zostały użyte do opracowania systemów przepływowych z konwencjonalną pompą perystaltyczną oraz systemów typu MPFA. Otrzymane układy analityczne umożliwiły fluorymetryczną detekcję fluoresceiny, jonów wapnia oraz białka. Dwa ostatnie systemy zostały z powodzeniem zastosowane do analizy prostych próbek rzeczywistych (wody mineralne i leki), a także próbek o bardziej złożonej matrycy (płyny fizjologiczne: surowica, mocz). Otrzymane wyniki potwierdzają praktyczną użyteczność detektorów typu PEDD.

12 Sensory PEDD

Jak pokazałam we wcześniejszych rozdziałach koncepcja PEDD umożliwia konstruowanie prostych i tanich, dedykowanych detektorów użytecznych analitycznie zarówno w pomiarach foto jak i fluorymetrycznych. Ostatnim etapem badań było opracowanie sensora typu PEDD.

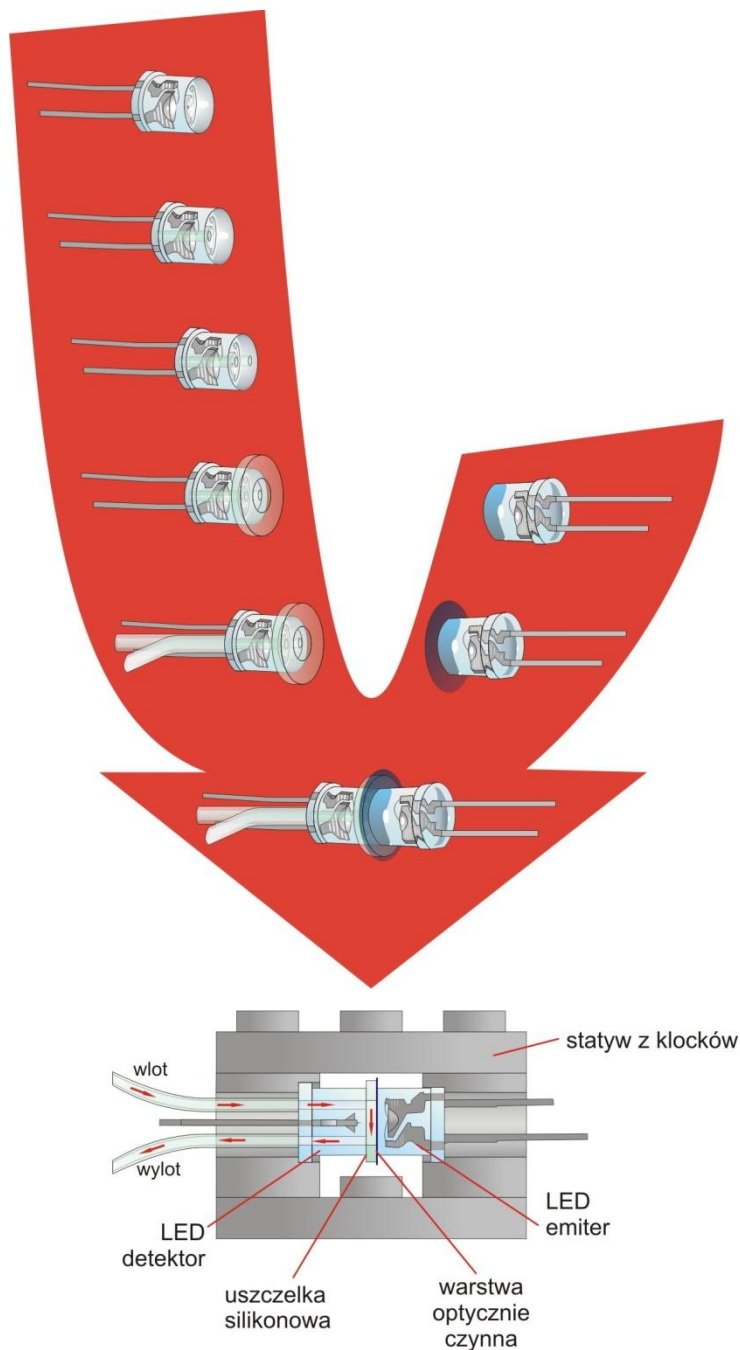
Sensory są interesujące z analitycznego punktu widzenia ponieważ pozwalają na selektywne oznaczanie analitu bez konieczności wstępnej, często złożonej, modyfikacji chemicznej. Za proces detekcji odpowiedzialna jest odpowiednia warstwa receptorowa, która w przypadku czujników optycznych, będzie powodować zmiany sygnału odpowiedniego elementu przetwornikowego, w przypadku moich badań: LED detektora. Ponieważ zarówno przetwornik jak i receptor są dedykowane dla konkretnej grupy lub pojedynczych analitów, pomysł użycia prostych systemów detekcji takich jak PEDD jest oczywisty.

12.1 Fotometryczne sensory PEDD

Ze względu na różną zasadę działania, konstrukcja sensora będzie mocno odbiegać od detektora. W przypadku detektora istotną rolę odgrywa droga optyczna, od której zależy ilość zabsorbowanego promieniowania. Tym samym ma ona kluczowy wpływ na czułość oznaczeń oraz zakres oznaczalności. W przypadku sensorów optycznych chemoreceptorowy element absorbujący występuje najczęściej w postaci cienkiego filmu, stąd też tworzenie drogi optycznej jest nie tylko niepotrzebne ale wręcz może negatywnie wpływać na wyniki oznaczeń.

Na rysunku 12.1 przedstawiam schemat konstrukcji opracowanego sensora PEDD. Do jego budowy użyłam dwóch diod elektroluminescencyjnych z płaskim czołem. W diodzie detektorze wywierciłam dwa kanały, wlotowy i wylotowy a na jej czole przykleiłam silikonowy pierścień uszczelniający, który oprócz zapewnienia szczelności układu określa wewnętrzną objętość celi przepływowej. Na zakończeniach kanałów przykleiłam dwa silikonowe węże umożliwiające połączenie z układem przepływowym. Dioda emiter, oprócz ewentualnego spłaszczenia powierzchni klosza, nie wymagała modyfikacji. Po przygotowaniu odpowiedniego chemoczułego filmu i umieszczeniu go na powierzchni emitera, obie diody umieściłam w specjalnie przygotowanym statywie z klocków Lego®, który dociskając

wszystkie elementy zapewniał szczelność układu. Otrzymany w ten sposób sensor posiada drogę optyczną o długości 0,25mm, obszar aktywny o powierzchni 0,07mm² i objętość wewnętrzną 1,7μL.

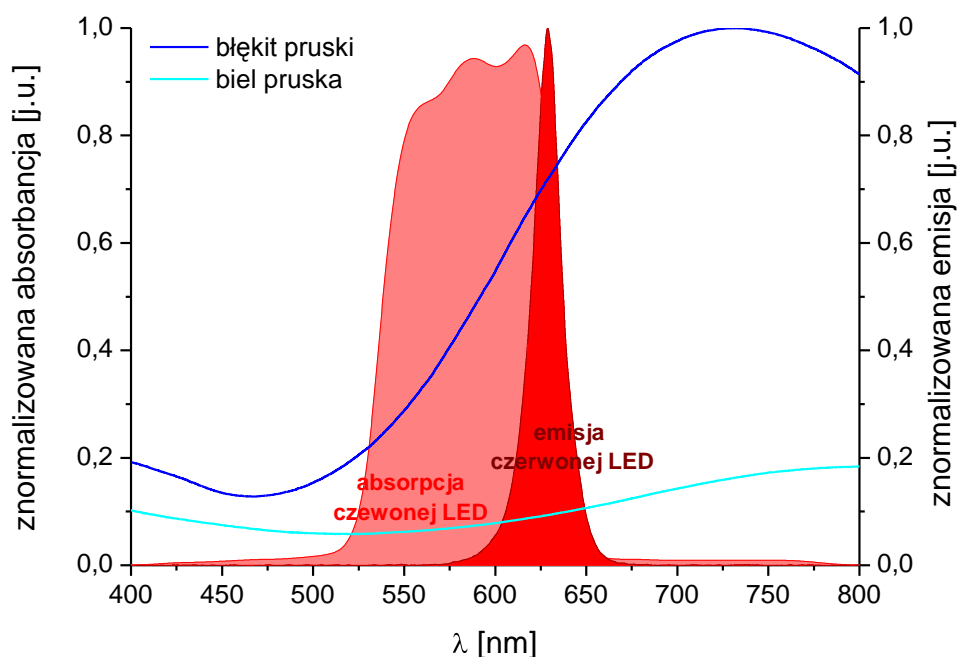


Rysunek 12.1 Schemat budowy sensora PEDD

Prezentowana konstrukcja ma charakter uniwersalny, można zastosować go do różnego rodzaju systemów detekcji z różnego rodzaju chemoczułymi materiałami. Wystarczy odpowiedni dobór pary emiter detektor oraz optymalizacja warunków prądowych.

12.2 Sensory typu PEDD z warstwą chemoczułą z błękitu pruskiego

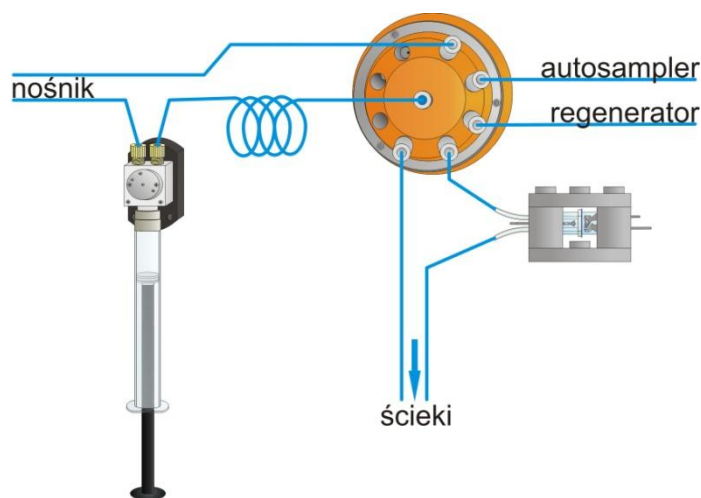
Błękit pruski, $KFe^{III}[Fe^{II}(CN)_6]$, to jeden z pierwszych barwników syntetycznych. Ponieważ tworzy nierozpuszczalne w wodzie warstwy znalazł zastosowanie również zastosowanie przy otrzymywaniu różnego rodzaju warstw chemoczułych. Ze względu na swoje właściwości redox znajduje szerokie zastosowanie w elektrochemii [92]. Udowodniono również, że można go również stosować jako optomembranę w czujnikach redoks [93]. Jest to związane z możliwością odwracalnej redukcji błękitu pruskiego do tzw. bieli pruskiej: $K_2Fe^{2+}[Fe^{2+}(CN)_6]$. Biel pruska jest formą mniej trwałą i za pomocą dowolnego utleniacza można ją utlenić do błękitu. Obydwa związki wykazują, zgodnie z nazwą, różne właściwości spektralne, co umożliwia ilościowe oznaczanie zarówno reduktorów (jeżeli formą receptorową jest błękit) jak i utleniaczy (jeżeli formą receptorową jest biel). Ponieważ biel pruska praktycznie nie absorbuje promieniowania widzialnego a błękit pruski absorbuje w szerokim zakresie od 600 do ok. 850nm, do jego oznaczeń można zastosować praktyczne dowolną czerwoną diodę elektroluminescencyjną. W moich badaniach jako źródło promieniowania i detektor wybrałam parę identycznych LED o maksimum emisji 630nm (rys. 12.2).



Rysunek 12.2 Widmo absorpcyjne błękitu i bieli pruskiej oraz zakres emisji i absorpcji czerwonej LED.

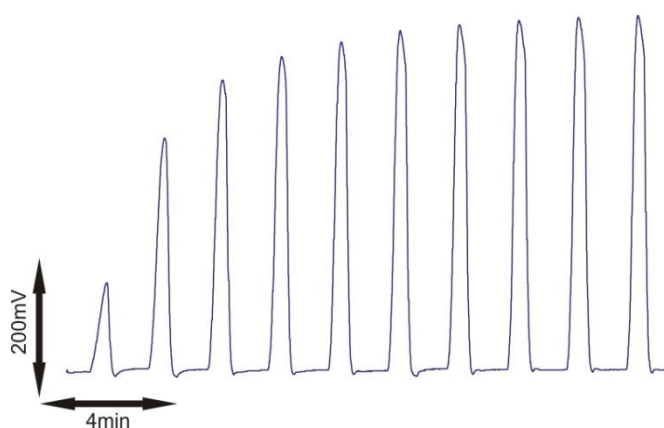
Filmy błękitu pruskiego przygotowałam poprzez zanurzenie transparentnej plastikowej folii (grubość 0,1mm) w 0,1M roztworze heksacyjanożelazianu(III) potasu i 1M kwasu solnego. Dodatkowo roztwór nasycony był kwasem 4-(pir-1yl)benzoesowym, który poprawiał trwałość i jednorodność powstałego filmu. W silnie kwaśnym środowisku z K_3FeCN_6 powstaje zieleń berlińska (heksacyjanożelazian(III) żelaza(III)), która ulega redukcji do błękitu pruskiego [93]. Równocześnie zachodzi polimeryzacja utleniająca kwasu pirylobenzoesowego. Obydwa procesy można przyspieszyć umieszczając zanurzone w roztworze folie pod źródłem promieniowania UV. Po 48 godzinach gotowe filmy płukałam wodą destylowaną, 0,1M kwasem solnym, oraz przez ok. godzinę kondycjonowałam w 0,1M buforze fosforanowym, o pH 7, otrzymanym z odpowiednich soli potasowych. Z gotowego filmu wycinałam fragment (5x5mm) i umieszczałam go między emiterym i detektorem celi przepływowej (rys. 12.1) a następnie zaciskałam konstrukcję w statywie z klocków, otrzymując w ten sposób gotowy sensor przepływowy PEDD.

Otrzymany sensor był testowany w systemie do sekwencyjnej analizy wstrzykowej. W skład układu przepływowego wchodziły 1mL pompa strzykawkowa, ośmiokanałowy zawór selekcyjny, 1mL pętla zatrzymująca oraz sensor PEDD (rys. 12.3). Za pomocą strzykawki do pętli zatrzymującej pobierane było 200µL regeneratora, który doprowadzał/regenerował film do formy receptorowej (był to nadtlenek wodoru w przypadku oznaczeń reduktorów lub kwas askorbinowy przy oznaczaniu utleniaczy). Następnie pobierane było 50µL nośnika, który pełnił funkcję separatora oraz 200µL próbki. Finalnie wszystkie segmenty, w odwróconej kolejności, kierowane były do detektora.



Rysunek 12.3 Schemat systemu SIA dedykowanego do oznaczeń utleniaczy i reduktorów za pomocą sensora PEDD.

Przed rozpoczęciem pomiarów kondycjonowałam filmy przez ich dziesięciokrotne utlenianie 10mM nadtlaniem wodoru w 0,01M kwasie solnym, w obecności 0,3M KCl oraz redukcję 10mM kwasem askorbinowym w 0,2M buforze fosforanowym pH 7. Jak widać na rysunku 12.4 w trakcie pierwszych sześciu cykli następował stopniowy wzrost czułości sensora. Jest to związane z przejściem błękitu pruskiego z tzw. formy nierozpuszczalnej ($Fe^{III}_4[Fe^{II}(CN)_6]_3$) otrzymywanej w toku procedury preparatywnej do bardziej reaktywnej tzw. formy rozpuszczalnej ($KFe^{III}[Fe^{II}(CN)_6]$) [94]. Dopiero po zakończeniu tego procesu możliwe było uzyskanie powtarzalnych wyników.



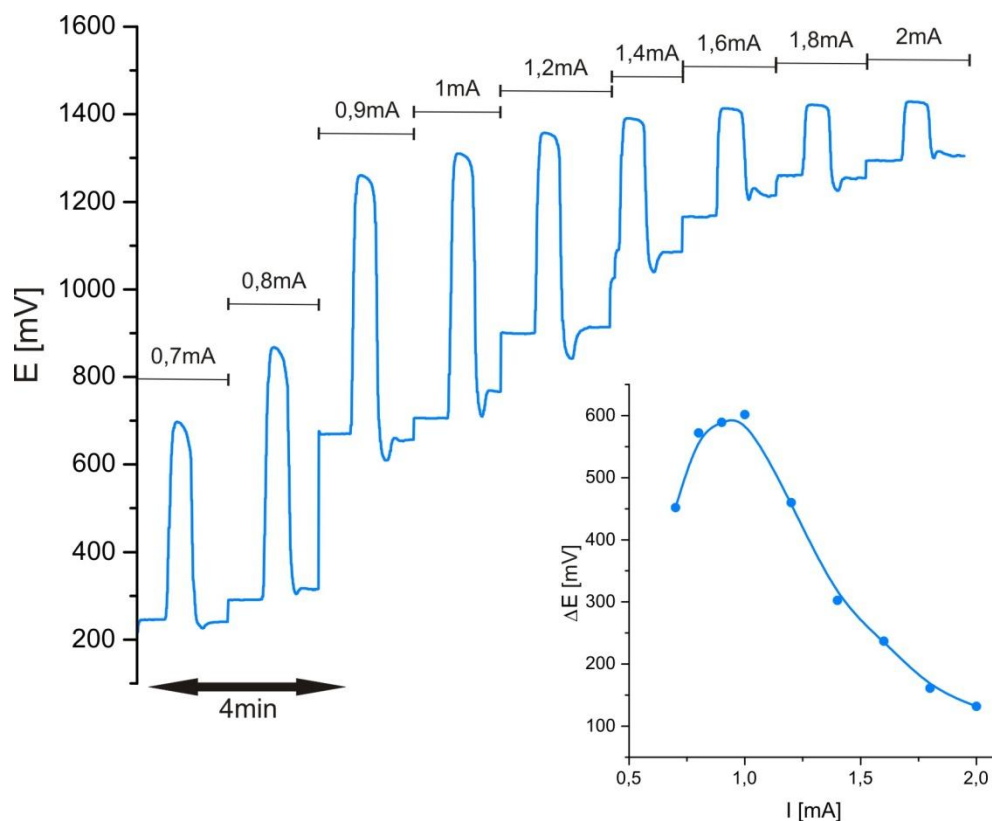
Rysunek 12.4 Przebieg procesu kondycjonowania filmu błękitu pruskiego.

12.2.1 Oznaczanie kwasu askorbinowego jako reduktora błękitu pruskiego

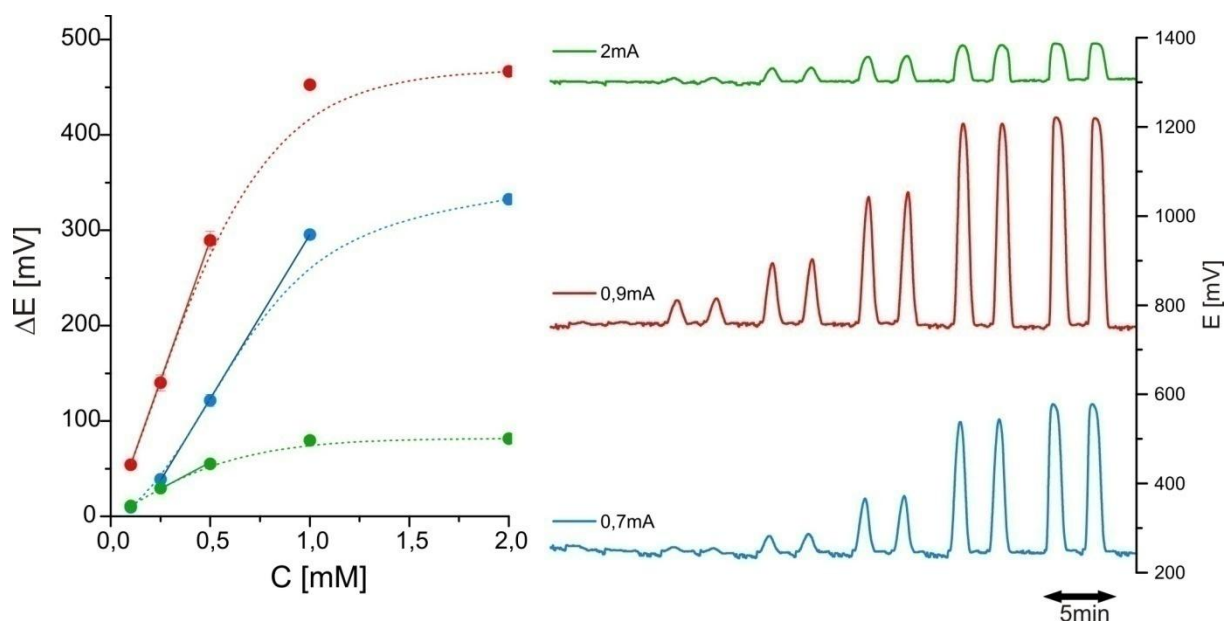
Ze względu na silne właściwości redukujące kwasu askorbinowego, formą receptorową optomembrany do jego oznaczeń był błękit pruski. Związek ten był stechiometrycznie redukowany do bieli co powodowało wzrost sygnału, a następnie za pomocą regeneratora- utleniany do niebieskiej formy. Roztworem nośnym oraz bazą dla wzorców był 0,2M bufor fosforanowy o pH 7, jako regeneratora używałam 10mM nadtlenu wodoru w 0,3M chlorku potasu w 0,01M kwasie solnym.

Ponieważ poszczególne filmy mogą różnić się między sobą grubością i intensywnością zabarwienia, oznaczenia rozpoczęłam od znalezienia wartości prądu zasilania diody emitera, przy której występować będzie największa różnica między sygnałami rejestrowanymi dla błękitu oraz bieli pruskiej. W tym celu wykonałam eksperyment podobny do pokazanego wcześniej kondycjonowania, z tym, że kolejne trzy piki były rejestrowane dla innej wartości natężenia prądu z zakresu od 0,7 do 2mA (rys 12.5). Jak można się było

spodziewać dla małych prądów intensywność emisji jest zbyt mała by wygenerować wysokie sygnały, natomiast dla dużych prądów widać wysycenie detektora dla bieli pruskiej, przy równoczesnym wzroście wartości napięcia dla linii bazowej.



Rysunek 12.5 Wpływ natężenia prądu zasilania źródła na wysokość linii podstawowej i sygnału.



Rysunek 12.6 Krzywe kalibracyjne kwasu askorbinowego zarejestrowane dla 3 różnych prądów zasilania źródła.

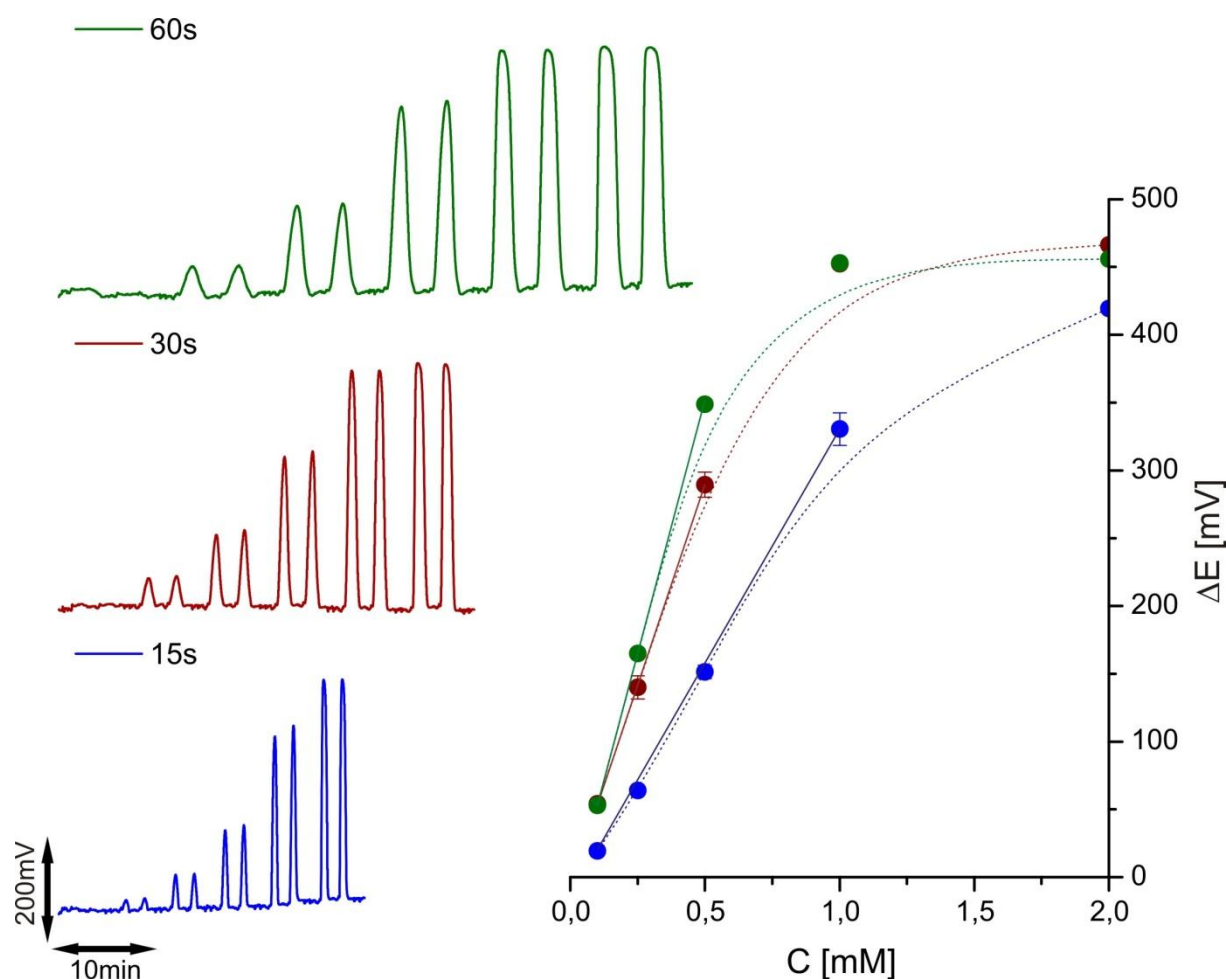
Największą czułość otrzymałam dla prądu o natężeniu 0,9-1mA. Jednak eksperyment ten mówił tylko o maksymalnej możliwej wysokości sygnału. Aby określić czułość i zakres prostoliniowości sensora, zarejestrowałam 3 krzywe kalibracyjne dla skrajnych (0,7 i 2 mA) i optymalnej (0,9 mA) wartości prądu zasilania źródła. Zmniejszyłam też maksymalne stężenie analitu do 2mM (rys. 12.6).

Otrzymane krzywe różnią się między sobą zarówno czułością jak i zakresem prostoliniowości. Przy zasilaniu emitera prądem o natężeniu 0,7mA otrzymałam krzywą o nachyleniu 342mV/Mm i zakresie prostoliniowości od 0,25 do 1mM, przy zasilaniu prądem o natężeniu 0,9mA 574mV/mM i zakres prostoliniowości od 0,1 do 0,5mM. Dla skrajnych wartości prądów praktycznie nie jest możliwe odczytanie sygnału dla najmniejszego stężenia (0,1mM) kwasu askorbinowego. Jak widać jest on bardzo niski, ze względu na małą czułość oznaczeń (dla prądu 2 mA), bądź pokrywa się z szumami linii podstawowej (wyniki dla prądu 0,7mA). Dlatego też w dalszych badaniach dioda emiter zasilana była prądem 0,9mA.

Kolejnym parametrem o kluczowym znaczeniu dla sygnału generowanego przez czujnik jest czas kontaktu roztworu analitu z powierzchnią filmu. Im szybszy przepływ, tym krótszy czas reakcji analitu z warstwą sensorową, mniej intensywne jej odbarwienie, a tym samym mniejsza czułość. Z drugiej strony proces ma charakter stechiometryczny a ilość błękitu pruskiego w warstwie jest ograniczona, w związku z tym zbyt duże stężenia przy wolnym przepływie powodują wysycenie warstwy sensorowej a w związku z tym zmniejszenie zakresu oznaczalności. Na rysunku 12.7 przedstawiam kalibracje zarejestrowane przy trzech różnych prędkościach przepływu (0,8; 0,4 i 0,27ml/min) i korespondujące krzywe kalibracyjne. Czas kontaktu segmentu analitu z warstwą sensorową wynosił więc odpowiednio 15, 30 i 45s. Jak widać, odpowiednio wybierając prędkość przepływu można nie tylko zmieniać przepustowość systemu, ale tak jak w przypadku doboru prądów, sterować czułością i zakresem prostoliniowej odpowiedzi sensora, dostosowując układ do pracy w różnych zakresach stężeń analitu. Ze względu na niewielkie różnice w czułości, i szerszy zakres oznaczalności w dalszych badaniach były prowadzone przy prędkości przepływu 0,8mL/min.

Po zoptymalizowaniu prądu zasilania i prędkości przepływu, sensor PEDD został zastosowany do oznaczenia kwasu askorbinowego w próbkach rzeczywistych. Przebadane zostały dwa preparaty farmaceutyczne *Aspirin+C* oraz *Supradym Active Multivitamin*. Pierwszy, dobrze rozpuszczalny w wodzie, natomiast drugi - tworzący zawiesinę.

Do oznaczeń referencyjnych użyto, zalecane w Farmakopei miareczkowanie jodometryczne [95]. Wyniki oznaczeń przedstawiam w tabeli 12.1. Dzięki odpowiednio dobranemu programowi analizy, polegającemu na umieszczeniu między analitem i regeneratorem segmentu nośnika, możliwe były oznaczanie nawet mętnych próbek, bez konieczności wcześniejszego przetwarzania próbki. Wynika to z faktu, że po odbarwieniu przez analit film nie ulega zmianie, aż do kontaktu z regeneratorem. Stosując więc odpowiednio długi segment separatora, można wymyć mętną próbkę i zarejestrować sygnał wynikający wyłącznie ze zmiany barwy sensora. Dobra zgodność między wynikami pomiarów referencyjnych i prowadzonych za pomocą sensora PEDD potwierdza jego użyteczność analityczną.



Rysunek 12.7 Krzywe kalibracyjne dla kwasu askorbinowego zarejestrowane dla trzech różnych czasów kontaktu segmentu próbki z powierzchnią sensora.

Tabela 12.1 Wyniki oznaczeń kwasu askorbinowego w próbkach farmaceutyków.

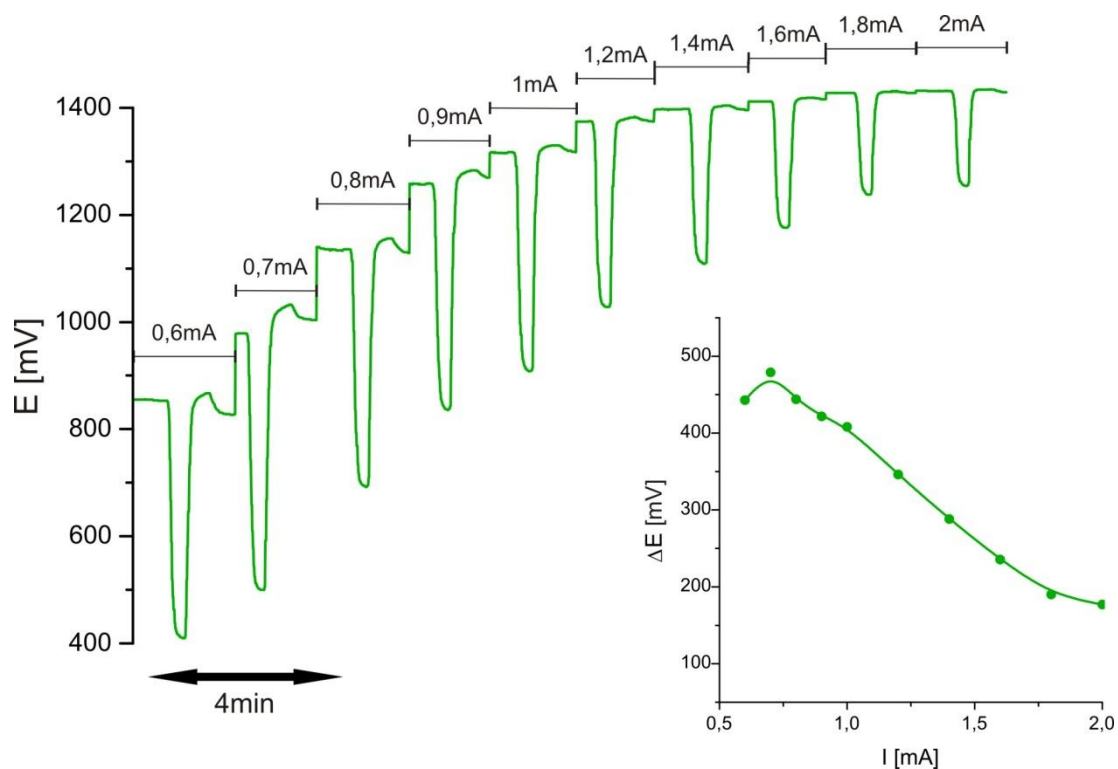
Próbka	Zawartość kwasu askorbinowego		
	deklarowana	Wyznaczona metoda referencyjną	Wyznaczona za pomocą sensora PEDD
Aspirin +C tabletki musujące	240mg/tab.	226±1mg/tab.	223±3mg/tab.
Supradyn Active Multivitamin tabletki musujące	60mg/tab.	48±2mg/tab.	45±5mg/tab.

12.2.2 Oznaczanie nadtlenu wodoru jako utleniacza bieli pruskiej

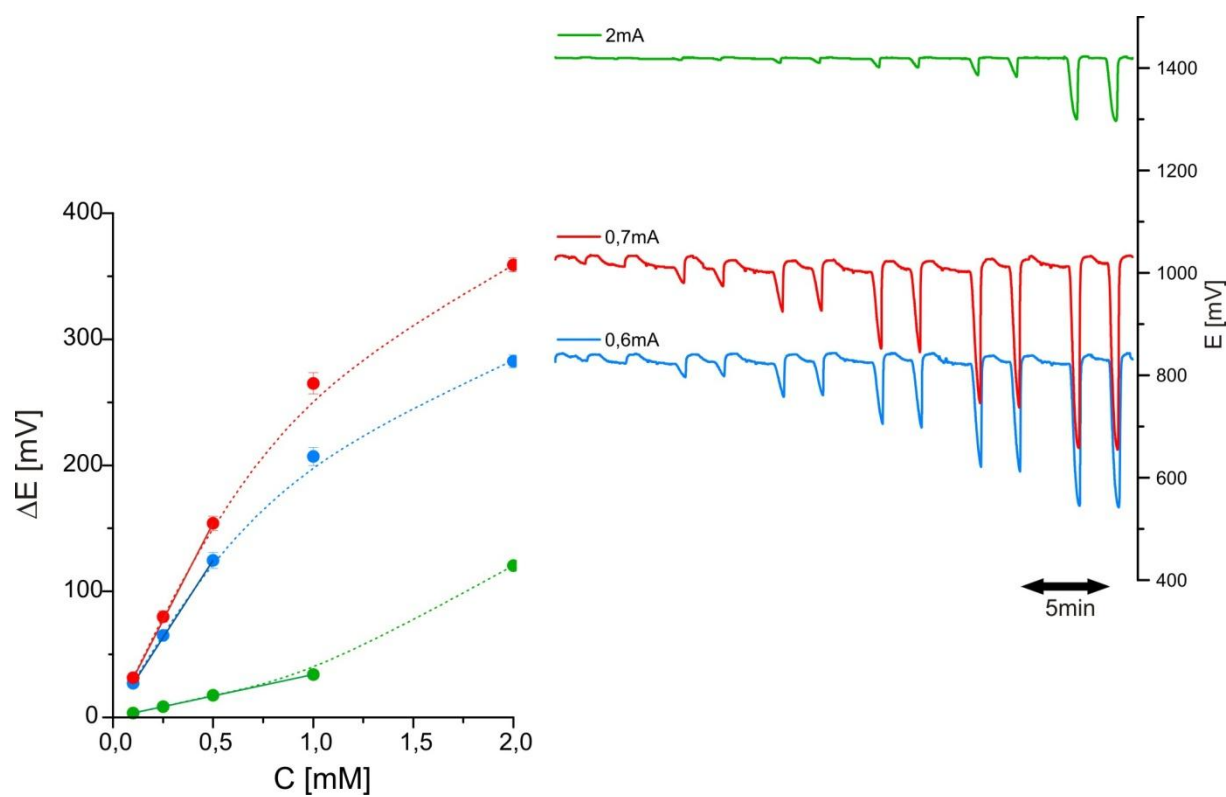
Do oznaczania utleniaczy, za pomocą filmów błękitu pruskiego, należy w porównaniu do procedury opisanej w poprzednim podrozdziale zamienić rolami anality i regeneratora. W tym przypadku warstwą receptorową jest biel pruska. Co za tym idzie przed rozpoczęciem pomiarów należało wstępnie zredukować film (dostarczając do detektora 0,2ml 10mM kwasu askorbinowego w buforze fosforanowym o pH 7). Ten sam roztwór pełnił później funkcję regeneratora. Jako nośnik i bazę dla wzorców (tu H_2O_2) zastosowałam 0,01M kwas solny z dodatkiem 0,3M KCl.

Tak jak w przypadku oznaczeń kwasu askorbinowego (rys. 12.6) optymalizację prądu zasilania wykonałam dwuetapowo- najpierw sprawdziłam dla jakiej wartości natężenia prądu zasilania źródła z zakresu od 0,6 do 2mA różnica sygnału między błękitem i bielą jest największa, a następnie wykonałam krzywe kalibracyjne dla trzech prądów (w optymalnych i skrajnych warunkach). Rezultaty tego eksperymentu przedstawiają rysunki 12.8 i 12.9.

Prawdopodobnie ze względu na różnice grubości filmów, otrzymane w tym eksperymencie maksymalne różnice sygnałów jak i nachylenia krzywych kalibracyjnych są niższe niż przy oznaczeniach kwasu askorbinowego (rys. 12.5 i 12.6). Kolejną różnicą jest widoczny po każdym pikie chwilowy wzrost wartości linii podstawowej- najprawdopodobniej związany z różną odpowiedzią bieli pruskiej na różnice pH nośnika i regeneratora.

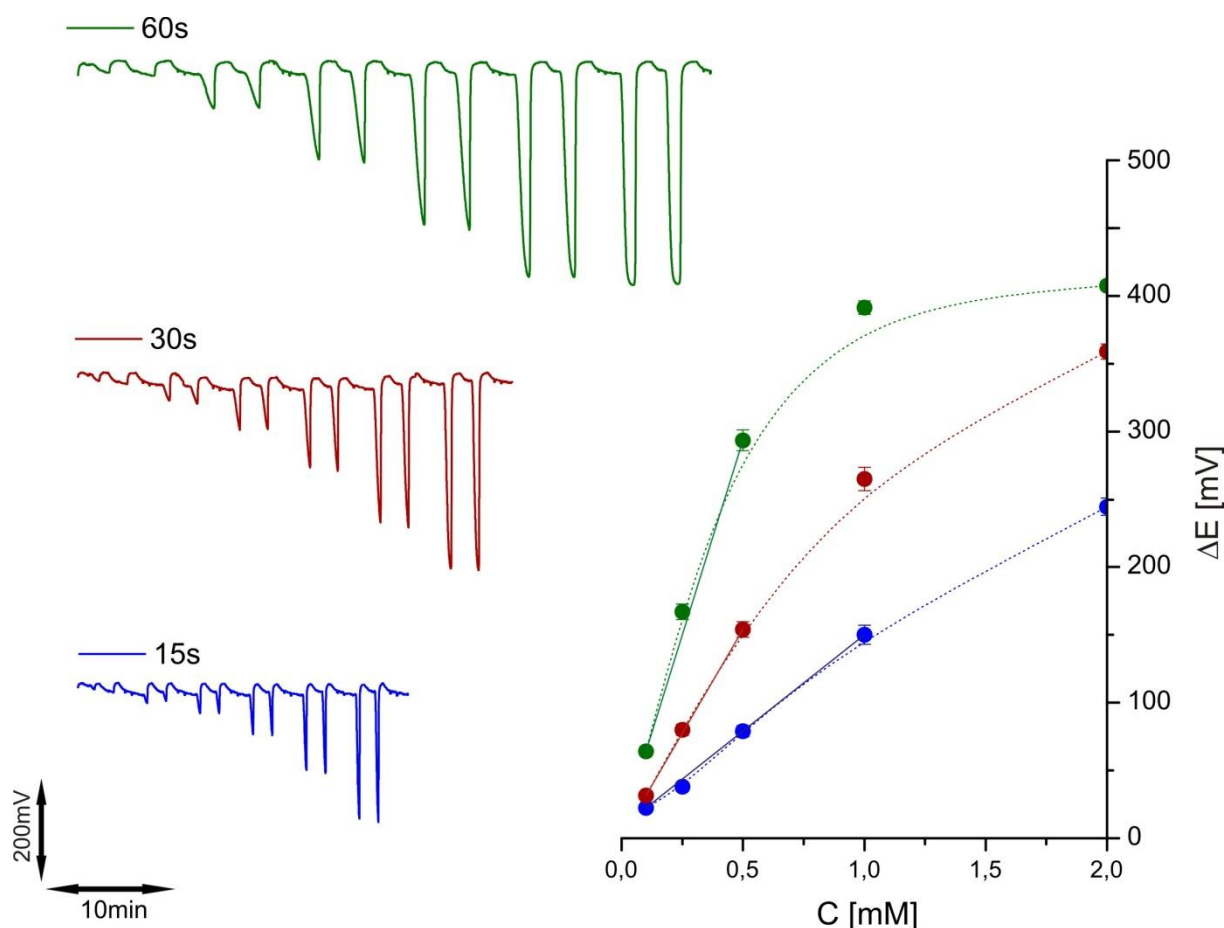


Rysunek 12.8 Wpływ natężenia prądu zasilania źródła na wysokość linii podstawowej i sygnału.



Rysunek 12.9 Krzywe kalibracyjne nadtlenu wodoru zarejestrowane dla trzech różnych prądów zasilania źródła.

Podobnie jak w poprzednich badaniach w tym przypadku również przebadalam wpływ czasu kontaktu próbki z warstwą na czułość oznaczeń. Ma to szczególne znaczenie ponieważ układ biel pruska/błękit pruski jest katalizatorem redukcji nadtlenu wodoru. Tym samym należy się spodziewać różnic w dynamice pracy sensora. Tak jak wcześniej zarejestrowalam krzywe kalibracyjne dla trzech prędkości tłoczenia roztworu (0,8; 0,4 i 0,27ml/min). Wyniki tych badań przedstawiłam na rysunku 12.10. Im dłuższy czas kontaktu analitu z sensorem tym większa intensywność zabarwienia membrany, większa różnica sygnałów i w związku z tym większa czułość. Z drugiej strony warstwa receptorowa ma określoną zawartość bieli pruskiej, która jest w stanie przereagować z analitem zanim ulegnie wysyceniu. Stąd malejący ze wzrostem czułości zakres prostoliniowej odpowiedzi sensora.

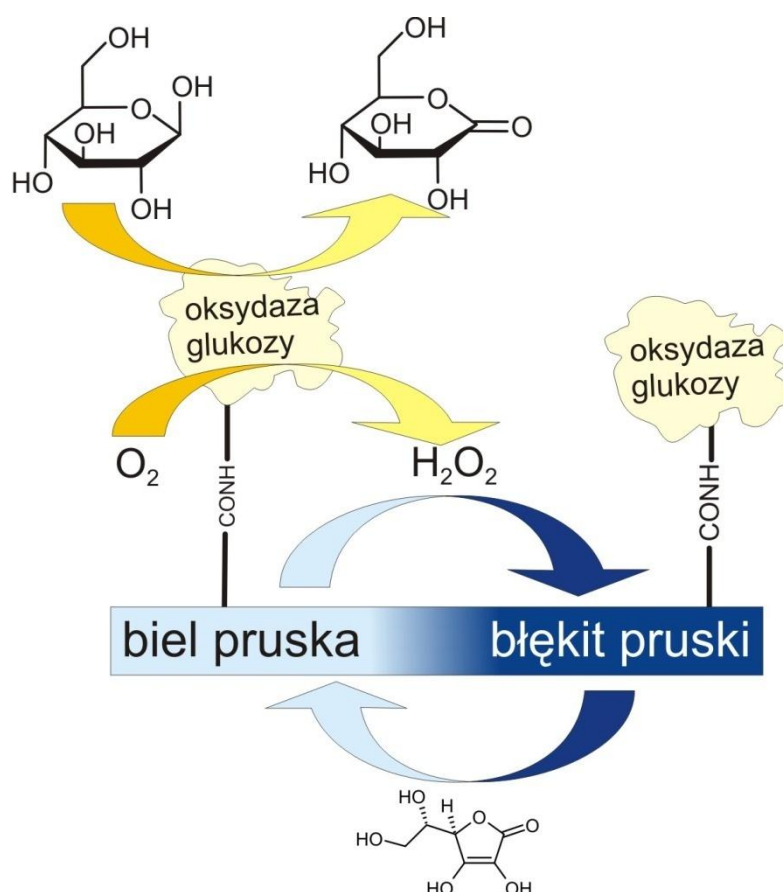


Rysunek 12.10 Krzywe kalibracyjne dla nadtlenu wodoru zarejestrowane dla trzech różnych czasów kontaktu segmentu próbki z powierzchnią sensora.

12.2.3 Biosensory PEDD

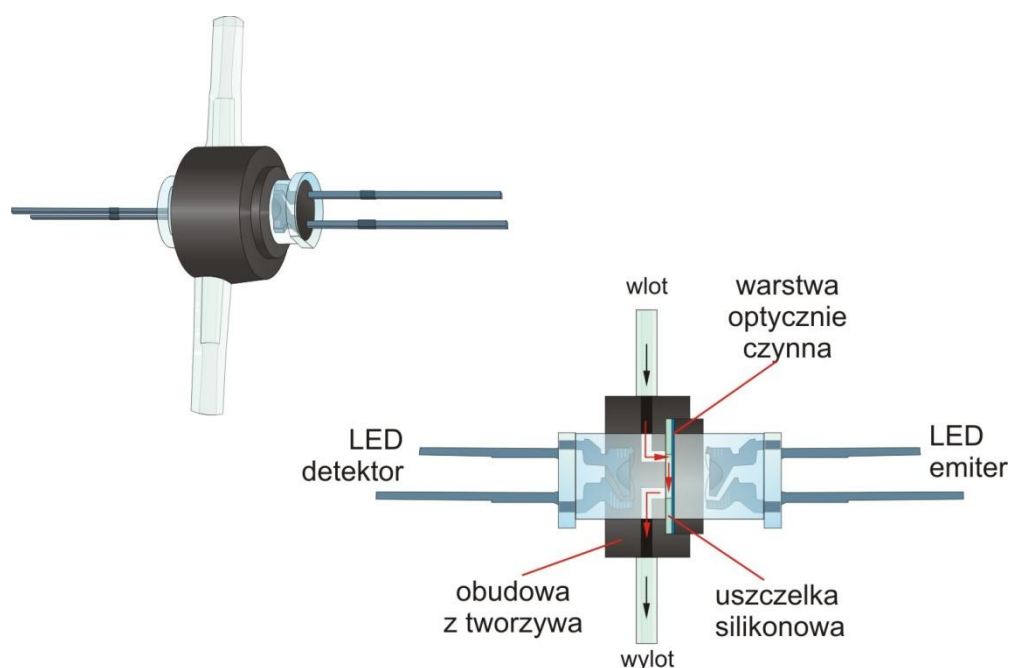
Przedstawiony w poprzednim podrozdziale system detekcji nadtlenu wodoru można zastosować w pomiarach bioanalitycznych, przekształcając opisany wyżej czujnik w bioczujnik. Unieruchamiając na powierzchni warstwy receptorowej odpowiedni enzym, można np. oznaczać substraty enzymów z grupy oksydoreduktaz [96].

Zawarty w filmach błękitu pruskiego kwas polipirylobenzoowy odpowiada za obecność na powierzchni warstwy receptorowej wolnych grup karboksylowych, do których za pomocą karbodiimidu (EDC) można kowalencyjnie łączyć cząsteczki enzymu [97]. Jako modelowy enzym wybrałam oksydazę glukozy, która katalizuje utlenianie β D-glukozy do glukonolaktonu, przy równoczesnej redukcji tlenu do nadtlenu wodoru, który można oznaczać za pomocą sensorowej warstwy bieli pruskiej. Schemat tego procesu biodetekcji przedstawiam ilustruje rysunek 12.11.



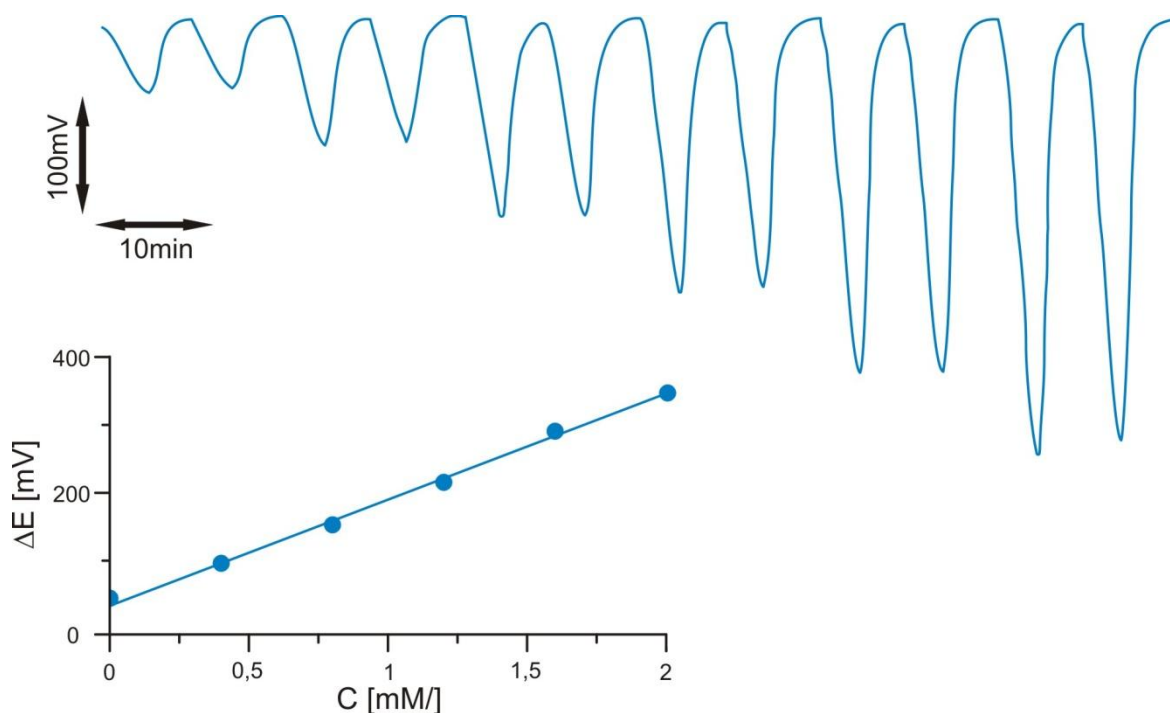
Rysunek 12.11 Schemat systemu detekcji glukozy za pomocą biosensora PEDD

Do tych oznaczeń biosensorowych zastosowany był układ sekwencyjnej analizy wstrzykowej o konfiguracji niemal identycznej jak w przypadku wcześniejszych oznaczeń kwasu askorbinowego i nadtlenku wodoru (rys. 12.3). Zmienione zostały objętości poszczególnych segmentów, pobierane było 0,1mL regeneratora, 0,05ml nośnika i 0,7mL próbki. Niewielkiej zmianie uległa również konstrukcja sensora PEDD (rys. 12.12). Zmiany polegały na umieszczeniu emitera i źródła w obudowie z PCV oraz zmianie kształtu kanałów wlotowego i wylotowego.



Rysunek 12.12 Schemat konstrukcji nowego sensora PEDD

Kolejną zmianą w stosunku do wcześniejszych oznaczeń był proces kondycjonowania filmu. Aby zapobiec ewentualnej denaturacji enzymu, stosowany w trakcie kondycjonowania nadtlenek wodoru był przygotowany w 0,2M buforze octanowym o pH 5. Kwas askorbinowy tak jak poprzednio, rozpuszczony był w 0,2M buforze fosforanowym o pH 7. Roztwory te zostały również zastosowane podczas optymalizacji warunków prądowych. Najlepsze rezultaty otrzymane były przy zasilaniu źródła prądem o natężeniu 0,6mA oraz tłoczeniu roztworów z prędkością 0,185mL/min. Przebieg oraz odpowiadającą mu krzywą kalibracyjną zarejestrowaną w tych warunkach za pomocą biosensora PEDD przedstawiam na rysunku 12.13.



Rysunek 12.13 Przebieg kalibracji glukozy prowadzonej za pomocą biosensora PEDD.

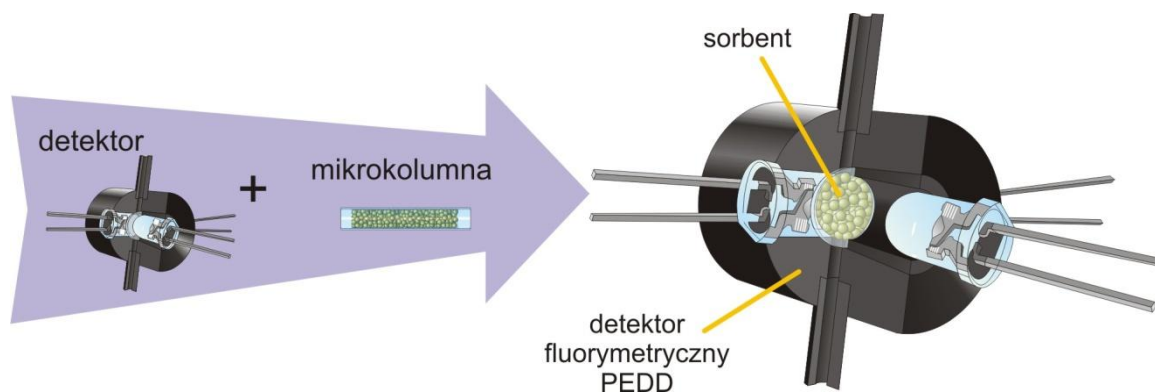
Jak widać biosensor zapewnia powtarzalne wyniki a jego trwałość sięga ok. 800 cykli pomiarowych. Dzięki niskiemu limitowi detekcji i szerokiemu zakresowi prostoliniowości, za jego pomocą można prowadzić analizę próbek biologicznych, w tym pomiary stężenia glukozy w surowicy krwi [96].

12.3 Sensor fluorymetryczny

W literaturze można znaleźć informacje o optosensorach fluorymetrycznych przeznaczonych do oznaczenia różnego rodzaju analitów. Jedną z koncepcji ich działania polega na umieszczeniu odpowiedniego sorbentu wewnątrz konwencjonalnej fluorymetrycznej kłuwety przepływowej, którą następnie umieszcza się w spektrofluorymetrze [98]. Oznacza to, że sorbent jest traktowany jako warstwa receptorowa rozpoznająca analit. Ponieważ wybór sorbentu predestynuje sensor do konkretnego rodzaju oznaczeń, ekonomicznym rozwiązaniem wydaje się zastosowanie takiego rozwiązania z przepływowym detektorem fluorymetrycznym typu PEDD.

Konstrukcja fluorymetrycznego czujnika PEDD może opierać się na opisanym w rozdziale 11.2 (rys. 11.8) przepływowym detektorze fluorymetrycznym z dwoma źródłami

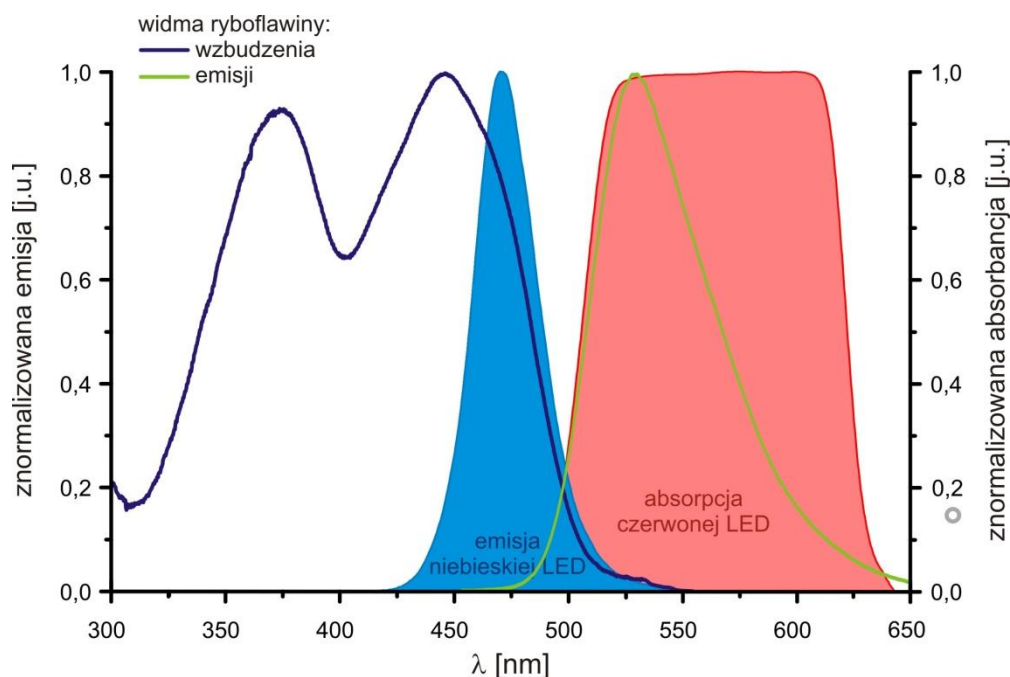
promieniowania wzbudzającego, którego wnętrze wypełnia się granulkami odpowiednio dobranego do analitu sorbentu (rys. 12.14). Aby zapobiec wymywaniu sorbentu wlot i wylot detektora należy zabezpieczyć watą szklaną. Tak jak w przypadku opisanego wcześniej czujnika fotometrycznego (rys. 12.1 i 12.12) to rozwiązanie konstrukcyjne również ma charakter uniwersalny.



Rysunek 12.14 Schemat sensora fluorymetrycznego PEDD.

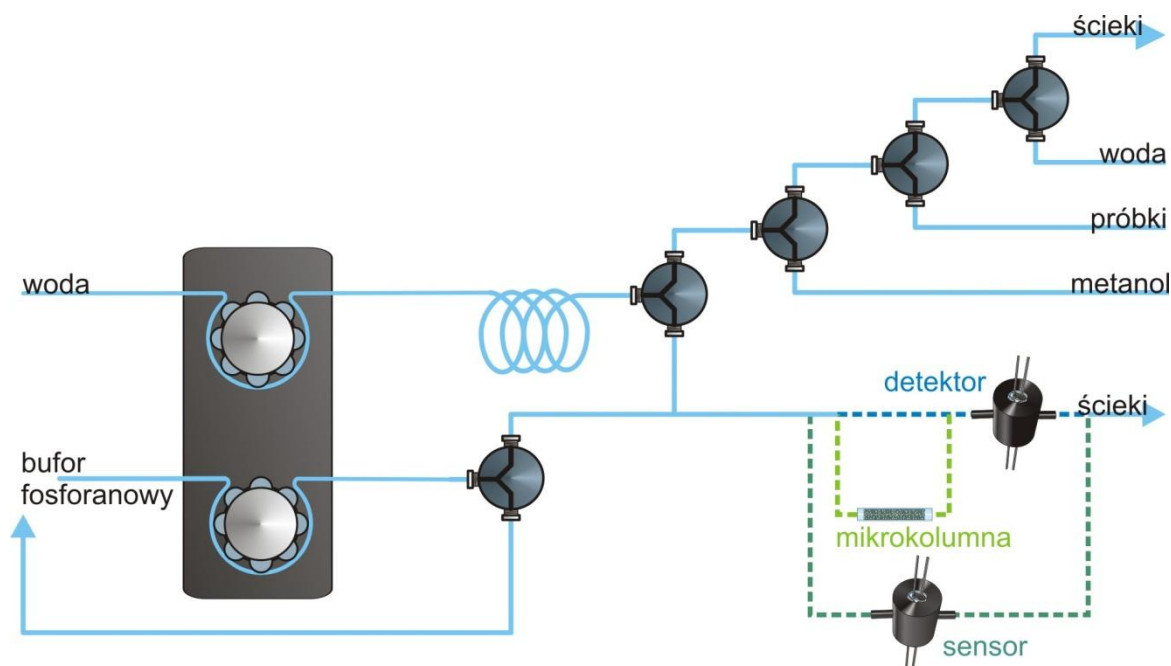
Jako modelowy analit do przetestowania fluorymetrycznego czujnika PEDD wybrana została witamina B2- ryboflawina. Ponieważ wykazuje ona naturalną fluorescencję w roztworach wodnych, najczęściej oznacza się ją w bezpośrednim pomiarze fluorymetrycznym bądź w połączeniu z innymi technikami: rozdzielającymi, (np. elektroforezą [99]) bądź zateżającymi (np. z zastosowaniem sorbentu C18 [100]). Opracowany został również sensor fluorymetryczny, z właśnie tym sorbentem [98]. Rozwiązanie to dobrze sprawdziło się w połączeniu z konwencjonalnym spektrofluorymetrem, powinno więc również współdziałać z detektorem PEDD.

Ponieważ maksimum absorpcji ryboflawiny przypada na 370 i 450nm jako źródła wzbudzenia wybrane zostały niebieskie diody o $\lambda_{\text{max}} = 470\text{nm}$. Można by zastosować również emiterzy UV o maksimum emisji przy 375nm, jednak niebieskie diody elektroluminescencyjne charakteryzują się znacznie większą światłością i zapewniają większą wydajność fluorescencji. Jako detektor wybrana została czerwona dioda o maksimum emisji przy 660nm, której zakres absorpcji, jak widać na rysunku 12.15, bardzo dobrze pokrywa się z widmem emisji ryboflawiny.



Rysunek 12.15 Widmo wzbudzenia i emisji ryboflawiny oraz zakres emisji niebieskiego emitera oraz absorpcji czerwonego detektora LED.

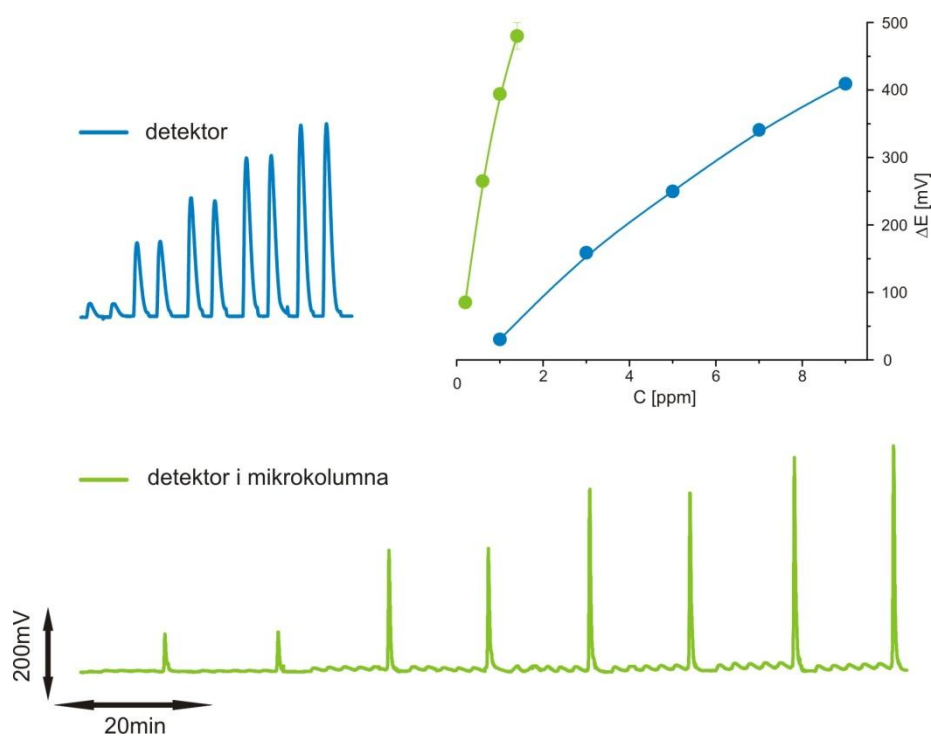
Oznaczenia prowadzone były w trzech wariantach: (1) bezpośredniej analizy ryboflawiny wyłącznie za pomocą detektora przepływowego, (2) po wstępnym załadowaniu na mikrokolumnie z sorbentem C18, umieszczonej przed detektorem, oraz (3) za pomocą czujnika fluorymetrycznego. Pomiary prowadzone były za w systemie MCFA widocznym na rysunku 12.16. W skład układu wchodziła dwukanałowa pompa perystaltyczna, pięć zaworów elektromagnetycznych oraz w zależności od wariantu: detektor, mikrokolumna z detektorem bądź sensor PEDD. Układ ten umożliwiał przygotowanie wzorców z jednego roztworu, dobór objętości wstrzykiwanej próbki oraz przygotowanie wodno- metanolowego roztworu do wymywania zadsorbowanego analitu.



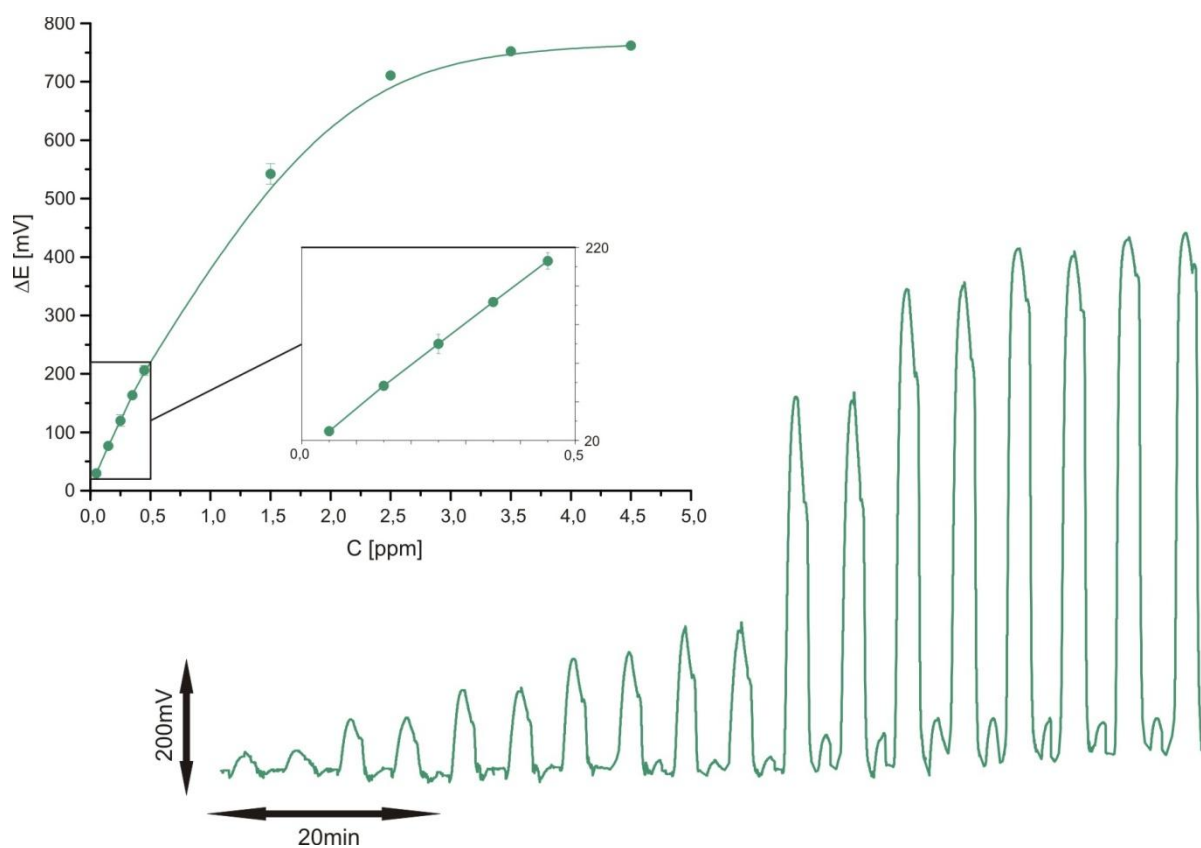
Rysunek 12.16 Układ przepływowy MCFA do oznaczeń ryboflawiny.

W pierwszym wariancie ryboflawina oznaczana była bezpośrednio w roztworze 0,1M buforu fosforanowego o pH 6,9. W tym trybie pomiarowym przy wstrzykiwaniu 0,25mL próbki udało się zarejestrować sygnały dla stężeń z zakresu od 1 do 9 ppm, uzyskany limit detekcji wynosił 0,2-0,3ppm, a czułość 43,7mV/ppm (rys. 12.17). Rezultaty te są porównywalne z możliwościami opisanymi w literaturze systemów bazujących na elektroforezie kapilarnej [99]. Wyniki te udało się poprawić w drugim wariancie eksperymentu po umieszczeniu przed detektorem mikrokolony wypełnionej sorbentem C18. Analit zawarty w 5mL próbki był zatrzymywany na kolumnie a następnie wymywany do detektora 2mL 25% roztworu metanolu. Zatrzymanie analitu na kolumnie pozwoliło na zwiększenie czułości i obniżenie limitu detekcji do 44 ppb. Wiązało się to oczywiście ze zwiększeniem objętości próbki i wydłużeniem czasu analizy (3- 4 iniekcje na godzinę). System udało się dodatkowo usprawnić przez zintegrowanie kolumny z detektorem do postaci optosensora.

Zwieńczeniem eksperymentu było zarejestrowanie za pomocą fluorymetrycznego optosensora, krzywej kalibracyjnej ryboflawiny. Zarejestrowane zostały sygnały dla roztworów o stężeniach od 0,05 do 4,5ppm (rys. 12.18). Przy zmniejszeniu objętości wstrzykiwanej próbki do 2mL udało się osiągnąć limit detekcji 22ppb oraz czułość 463mV/mg czyli 10 krotnie większą niż dla samego detektora. Równocześnie poprawiła się przepustowość układu, do 14 próbek na godzinę.



Rysunek 12.17 Krzywe kalibracyjne otrzymane za pomocą detektora PEDD w pomiarze bezpośrednim oraz przy wstępnym załadowaniu próbki na mikrokolumnie .



Rysunek 12.18 Kalibracja ryboflawiny otrzymana za pomocą fluorymetrycznego optosensora PEDD.

12.4 Podsumowanie

Badania opisane we wcześniejszych częściach tej pracy dotyczyły *detektorów* fotometrycznych (rozdziały 8 i 10) oraz fluorymetrycznych (rozdziały 9 i 11). W tym rozdziale zajęłam się *sensorami* przepływowymi typu PEDD otrzymywanymi przez integrację warstwy receptorowej z odpowiednią kombinacją diod elektroluminescencyjnych. Przedstawiłam fotometryczny sensor redoks bazujący na chemoczułej warstwie błękitu pruskiego, a także prototyp biosensora glukozowego otrzymanego przez modyfikację tej warstwy oksydazą glukozy. Ponadto zademonstrowałam możliwość wytworzenia fluorymetrycznego sensora typu PEDD czułego na ryboflawinę. Sensor powstał przez integrację odpowiednio dobranych LED ze złożem sorbentu C18 pełniącym funkcję zatężającej warstwy receptorowej.

13 Podsumowanie badań własnych

W części literaturowej rozprawy (rozdział 4) przedstawiłam wcześniejsze doniesienia literaturowe o możliwościach zastosowania diod elektroluminescencyjnych jako selektywnych detektorów optoelektronicznych oraz ich przykładowe zastosowania w chemii analitycznej jako tzw. detektory PEDD (ang. *Paired Emitter - Detector Diodes*). Prezentowany w nich system pomiaru sygnału jest jednak, mimo pozornej prostoty, trudny do odtworzenia bez dostatecznej wiedzy z dziedziny elektroniki i programowania. Dlatego też swoje badania rozpoczęłam od opracowania prostszego rozwiązania, bazującego na pomiarze sygnału potencjałowego (rozdział 7.2).

Duże znaczenie dla pomiarów w opracowanym urządzeniu, ma sposób rejestracji sygnału napięciowego. Rejestrowana urządzeniem o wysokiej oporności wewnętrznej SEM pozwala na otrzymanie prostoliniowych zależności kalibracyjnych w szerokim zakresie stężeń. Korzystając z równania Shockleya dla idealnej diody oraz fundamentalnego dla spektrofotometrii prawa Lamberta- Beera, wykazałam, że wygenerowany na diodzie detektorze sygnał potencjałowy jest wprost proporcjonalny do stężenia analitu. Sygnały mierzone przy pomocy zwykłego woltomierza tracą swój prostoliniowy charakter, oferując jednak znacznie większą czułość oznaczeń (rozdział 8.1).

W trakcie wstępnych badań udało mi się potwierdzić selektywność diody elektroluminescencyjnej jako detektora. Dzięki wąskim zakresom emisji i czułości spektralnej LED skonstruowałam bardzo proste a zarazem selektywne urządzenia pomiarowe, które doskonale sprawdziły się zarówno w analizie fotometrycznej substancji fluoryzujących jak i równoległym oznaczaniu składników mieszaniny (rozdział 8.2, 8.3, 10.2)

Ze względu na dynamiczny a zarazem stabilny charakter detektorów PEDD, udało mi się zaadaptować je do pracy w warunkach analizy przepływowej. A ponieważ klosz diody dość łatwo podlega obróbce mechanicznej, udało mi się przetestować różne warianty konstrukcyjne detektora przepływowego (rozdziały 10.1, 10.3). Bardzo dobre rezultaty otrzymałam zarówno w przypadku urządzeń ze zintegrowaną jak i zewnętrzną celą pomiarową. Dodatkowo udało się opracować rozwiązania techniczne pozwalające na otrzymanie sensorów oraz biosensorów typu PEDD (rozdziały 12.1 i 12.2)

Zdecydowaną nowością w odniesieniu do wcześniejszych doniesień literaturowych jest stwierdzona przeze mnie możliwość konstrukcji fluorymetrów typu PEDD (rozdział 9). Okazało się to możliwe ponieważ w trybie fotowoltaicznym diody elektroluminescencyjne

mogą być znacznie czulszymi detektorami niż fotodiody. Z drugiej strony udało mi się zwiększyć wydajność fluorescencji dzięki zastosowaniu maksymalnej możliwej intensywności emisji źródła promieniowania wzbudzającego. Dodatkowo wydajność detektorów fluorymetrycznych udało mi się poprawić dzięki zastosowaniu dwóch, umieszczonych naprzeciw siebie emiterów (rozdział 11.2). Dzięki selektywności LED, do konstrukcji detektorów fluorymetrycznych nie trzeba używać dodatkowych elementów optycznych, (filtry, kolimatory etc.). Odpowiedni dobór detektora pozwala na prowadzenie skutecznych pomiarów nawet w sytuacji kiedy np. na skutek rozproszenia, część promieniowania źródła dociera do detektora. Jest to niewątpliwą zaletą zaprezentowanego przeze mnie rozwiązania.

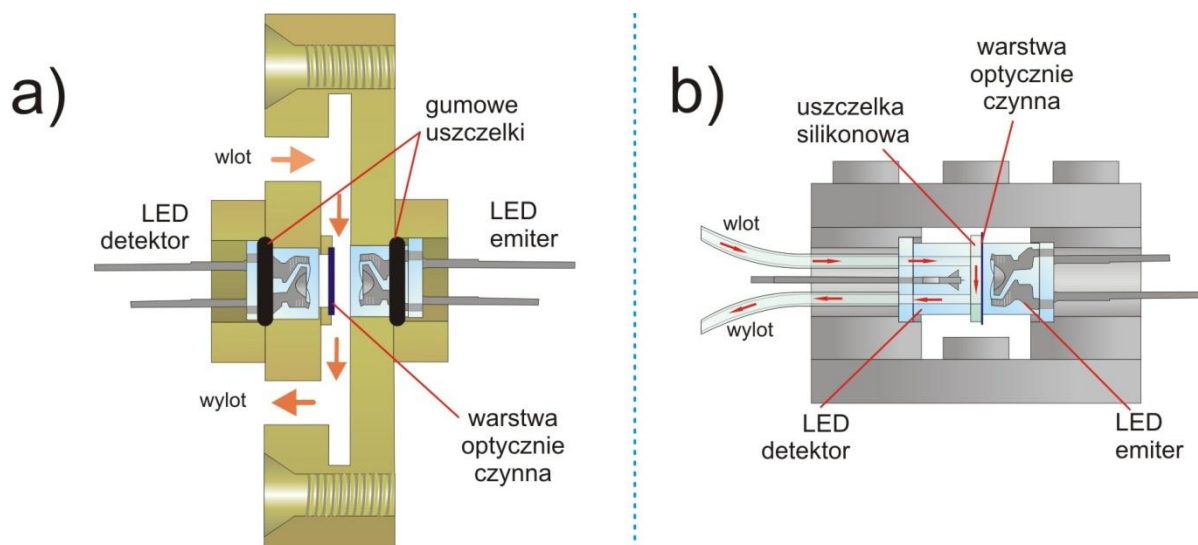
W ramach prowadzonych przeze mnie badań wykazałam, że przy użyciu wyłącznie diod elektroluminescencyjnych można otrzymać bardzo proste, selektywne, adaptowalne do oznaczeń przepływowych detektory fotometryczne i fluorymetryczne. Otrzymane detektory z powodzeniem zastosowałam do oznaczeń zarówno modelowych analitów, jak barwniki czy jony metali, jak i próbek farmaceutyków oraz w pomiarach bioanalitycznych. Wyniki prowadzonych za pomocą detektorów PEDD oznaczeń dla próbek rzeczywistych bardzo dobrze korelują z rezultatami analiz wykonanych metodami referencyjnymi.

Rezultaty większości badań opisanych w tej rozprawie zostały opublikowane w cyklu następujących publikacji mojego współautorstwa:

1. Ł. Tymecki, M. Pokrzywnicka, R. Koncki; "Paired emitter detector diode (PEDD) based photometry - an alternative approach", *Analyst*, 133 (2008) 1501-1504
2. M. Pokrzywnicka, R. Koncki, Ł. Tymecki; "A Very Simple Photometer Based on Paired-Emitter-Detector Diodes", *Chemia Analityczna.*, 54 (2009) 427-435
3. M. Pokrzywnicka, R. Koncki, Ł. Tymecki; „A concept of dual optical detection using three light emitting diodes”, *Talanta*, 82 (2010) 422-425
4. Ł. Tymecki, M. Pokrzywnicka, R. Koncki, "Sparowane diody elektroluminescencyjne jako detektory fotometryczne dedykowane do analizy przepływowej", w monografii "Analiza przepływowa - metody i zastosowania", *Wydawnictwa Uniwersytetu Jagiellońskiego*, Kraków, Tom 3 (2011) 189-204

5. M. Pokrzywnicka, D.J. Cocovi-Solberg, M. Miro, V. Cerda, R. Koncki, Ł. Tymecki; "Miniaturized optical chemosensor for flow-based assay", *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 399 (2011) 1381-1387
6. Ł. Tymecki, M. Pokrzywnicka R. Koncki; "Fluorometric paired emitter detector diode (FPEDD)", *Analyst*, 136 (2011) 73-76
7. Ł. Tymecki, M. Rejnis, M. Pokrzywnicka, K. Strzelak, R. Koncki, „Fluorimetric detector and sensor for flow analysis made of light emitting diodes”; *Analytica Chimica Acta* 721 (2012) 92-96
8. M. Pokrzywnicka, M. Fiedoruk, R. Koncki, „Compact optoelectronic flow-through device for fluorometric determination of calcium ions”; *Talanta* 93 (2012) 106-110
9. D.J. Cocovi-Solberg, M. Miro, V.Cerda, M. Pokrzywnicka, Ł. Tymecki, R. Koncki, "Towards the development of a miniaturized fiberless optofluidic biosensor for glucose"; *Talanta* 96 (2012) 113-120
10. M. Pokrzywnicka, Ł. Tymecki, R. Koncki, "Low-cost optical detectors and flow systems for protein determination"; *Talanta* 96 (2012) 121-126

Należy zaznaczyć, że tematyka detektorów PEDD jest w dalszym ciągu rozwijana. Równolegle z prowadzonymi przeze mnie badaniami powstawały inne prace dotyczące zastosowania diod elektroluminescencyjnych jako detektorów promieniowania. Grupa Diamonda kontynuowała badania systemów opartych na pomiarze czasu zaniku napięcia na diodzie detektorze, stosując je z optosensorami do detekcji oparów kwasowych. Za pomocą pary: żółty emiter - czerwony detektor porównywali oni m.in. różne metody unieruchamiania warstwy chemoreceptorowej z błękitu bromofenolowego i etylocelulozy na powierzchni klosza diody. Warstwa chemoczuła optycznie nanoszona była metodą „*drop coating*” oraz napyłania tzw. „*inkret - printing*” [101]. Ta druga metoda pozwalała na otrzymywanie dużo bardziej odtwarzalnych warstw sensorowych, jednak rezultaty prawdopodobnie nie okazały się zadowalające ponieważ autorzy przy współpracy z grupą Capitan - Vallvey’a (Uniwersytet w Grenadzie) zaproponowali zupełnie inną konstrukcję czujnika [102] (rys.13.1). Jest ona bardzo podobna do rozwiązania zaproponowanego w rozdziale 12 mojej pracy doktorskiej.



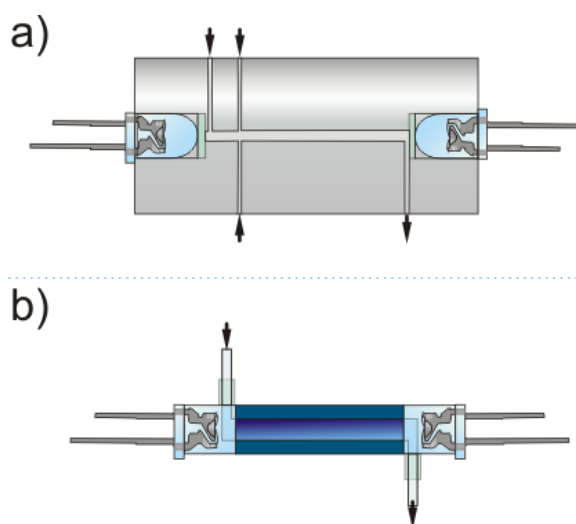
Rysunek 13.1 a) Nowa konstrukcja sensora gazowego opisana przez grupę Diamonda i Capitan Vallvey'a [102] oraz b) opracowana w mojej grupie badawczej konstrukcja sensora przepływowego (rozdział 12.1 - rys. 12.1).

Warstwa chemoczuła (tym razem z unieruchomioną zielenią bromokrezolową) umiejscowiona została na powierzchni cienkiej folii PET. Folię umieszczono między żółto-zieloną i czerwoną LED w specjalnie opracowanym teflonowym naczyniu przepływowym. Rozwiązanie to zostało później odtworzone przy konstrukcji czujnika CO₂ [103]. Urządzenie to składało się z dwóch cel pomiarowych, które początkowo miały służyć do równoległych pomiarów metodą fotometryczną oraz hybrydą foto/fluorymetryczną. Obie metody bazowały na zmianie zabarwienia α -naftaloftaleiny w obecności dwutlenku węgla, przy czym w metodzie hybrydowej barwnik miał absorbować promieniowanie emitowane przez unieruchomiony po drugiej stronie membrany oktaetyloporfirynewy kompleks platyny. Stąd też do oznaczeń fotometrycznych wybrana została para identycznych czerwonych LED natomiast w metodzie mieszanej zielony emiter i czerwony detektor. Ponieważ metoda hybrydowa okazała się znacznie gorsza (co mogło wynikać m.in. z naprzeciwległego umieszczenia źródła promieniowania wzbudzającego i detektora), druga celn pomiarowa ostatecznie została zastosowana do pomiarów dla próby „ślepej”, pozwalających niwelować efekty od szumów detektora. Nie porzucono jednak próby stworzenia fluorymetrycznego optosensora PEDD. Najnowsza publikacja z tego zespołu badawczego opisuje możliwość zastosowanie membrany ze wspomnianym wcześniej oktaetyloporfirynewym kompleksem platyny, do oznaczeń tlenu [104].

Przy okazji sensorów gazowych warto również wspomnieć o innej konstrukcji. Lange, Lima i Köhlke [105] zaproponowali zastosowanie czterochipowej powierzchniowo

montowanej diody mocy z dwiema warstwami optycznie czynnymi jako sensora fluorymetrycznego do pomiaru temperatury i oznaczeń zawartości tlenu. Jako element termowrażliwy zastosowany został rubin, natomiast do oznaczeń tlenu wybrano kumarynowy kompleks irydu(III). Autorzy najpierw sprawdzili właściwości spektralne poszczególnych diod żeby zastosować taką kombinację emiterów i detektorów, która pozwoli na prowadzenie równoległych pomiarów bez wzajemnych interferencji. Wadą proponowanego sensora wydaje się system pomiaru sygnału analitycznego, którym było natężenie wygenerowanego na detektorze LED fotoprądu.

W moim rodzimym zespole kontynuowane są badania bioanalityczne z detektorami PEDD działającymi w potencjometrycznej konfiguracji pomiarowej. Mieczkowska i inni [106] zaprezentowali prosty system pomiarowy z parą żółto-zielonych diod elektroluminescencyjnych do oznaczeń hemoglobiny w warunkach stacjonarnych. Przepływowe detektory PEDD stosowane były również przy testowaniu różnego rodzaju modernizacji układów MCFA. Tymecki i inni [80] z ich pomocą zaproponował możliwość prowadzenia kalibracji z użyciem jednego roztworu wzorca. Przetestowany na modelowych analitach: błękanie bromotymolowym i paranitrofenolu system przeznaczony jest do pracy w połączeniu z metodami detekcji w których obserwuje się liniową zależność sygnału analitycznego od stężenia, dlatego dobrze sprawdził się w połączeniu z fotometrycznym detektorem PEDD. Powstał również cykl publikacji [107-109] opisujących możliwości zastosowania detektora PEDD do oznaczeń aktywności fosfataz kwaśnej i alkalicznej. Fioletowy emiter i niebieski detektor zostały użyte do monitorowania stężenia paranitrofenolu, który powstawał na skutek katalizowanej przez enzym reakcji hydrolizy fosforanu paranitrofenylu [107]. Ten system monitorowania aktywności enzymu z powodzeniem została zastosowany zarówno w klasycznej wstrzykowej analizie przepływowej [107], jak i technikach opartych na urządzeniach mikrosolenoidowych [108]. Ciekawym pomysłem było zaproponowane przez Rozum i innych zintegrowanie detektora PEDD z bioreaktorem przepływowym [109] (rys. 13.2). Umieszczenie pomiędzy emiterem a detektorem plastikowego bioreaktora umożliwia oznaczanie substratów reakcji enzymatycznej bezpośrednio w obrębie bioreaktora.



Rysunek 13.2 a) celi pomiarowa do bezpośredniego wstrzyku próbki [110], b) opracowany w naszej grupie badawczej detektor PEDD zintegrowany z bioreaktorem [109]

Podobnym rozwiązaniem jest konstrukcja celi pomiarowej do bezpośredniego wstrzyku próbki [110] (rys. 13.2). Zgodnie z założeniem teflonowa celi pomiarowa pełni również funkcję elementu mieszającego. Rozwiązanie to z powodzeniem zastosowano do oznaczania żelaza metodą rodankową w próbkach środowiskowych [111].

Oryginalnym rozwiązaniem jest konstrukcja zautomatyzowanego titratora do miareczkowań alkacymetrycznych, zaproponowanego przez grupę Reisa [112]. Kluczowym dla tego systemu było rejestrowanie sygnału analitycznego w formie napięcia. Pomiar wygenerowanego napięcia ułatwia zintegrowanie detektora z mikrokontrolerem i umożliwia tworzenie dość prostych zautomatyzowanych systemów i urządzeń pomiarowych.

Przycoczenie najnowszych publikacji dotyczących PEDD w tym rozdziale, w podsumowaniu, nie zaś w części literaturowej) ma dwa cele. Pierwszym z nich jest pokazanie jakie zagadnienia/ problemy zostały rozwiązane w tej rozprawie po raz pierwszy. Najkrócej ujmując zaliczyłabym do nich: (i) wskazanie potencjometrycznej metody rejestracji sygnału analitycznego generowanego przez PEDD, (ii) wskazanie przydatności detektorów PEDD do użytecznych analitycznych pomiarów fluorescencji (także w konfiguracji sensorowej), (iii) zademonstrowanie konstrukcji nie-gazowych sensorów (a także biosensorów) typu PEDD. Drugim celem jest wyraźne wskazanie, że tematyka zastosowań analitycznych PEDD, początkowo niszowa (do roku 2008 realizowana przez jeden zespół naukowy), jest rozwojowa i zaczyna być realizowana w różnorodnych kierunkach i przez różne ośrodki naukowe, po części także dzięki badaniom opisanym w tej rozprawie.

14 Literatura cytowana

- [1] P. Dietz, W. Yerazunis, D. Leigh; "Very Low- Cost Sensing and Communication Using bidirectional LEDs", *http://www.merl.com/reports/docs/TR2003-35.pdf*
- [2] M. Mori, A. Hamamoto, A. Takahashi, M. Nakano, N. Wakikawa, S. Tachibana, T. Ikehara, Y. Nakaya, M. Akutagawa, Y. Kinouchi; "Development of a new water sterilization device with a 365 nm UV-LED", *Medical and Biological Engineering and Computing* 45 (2007) 1237-1241
- [3] E. Kviesis-Kipge, J. Zaharans, O. Rubenis, A. Grabovskis; "A photoplethysmography device for multipurpose blood circulatory system assessment", *European Conference on Biomedical Optics (ECBO)* Monachium, Niemcy (22.05.2011)
- [4] S.Y. Lee, C.E. You, M.Y. Park; "Blue and red light combination LED phototherapy for acne vulgaris in patients with skin phototype", IV, *Lasers Surgery Medicine* 39 (2007) 180-188
- [5] <http://electronics.howstuffworks.com/oled6.htm>
- [6] <http://www.lednews.pl/perspektywy-rozwoju-oswietlenia-led-do-2020-mckinsey-company>
- [7] http://nobelprize.org/nobel_prizes/physics/laureates/1956/shockley-lecture.pdf
- [8] E.F. Shubert; "Light Emitting Diodes", *Cambridge University Press* (2006)
- [9] „Encyklopedia Techniki”, *Wydawnictwa Naukowo Techniczne* (1994)
- [10] E. Dehler, B. Grimm, G. Häberle, W. Philipp, B. Schiemann, W. Schleer, D. Schnell; "Podstawy elektroniki", *REA* (2006)
- [11] M. Bass, E.W. Van Stryland, D.R. Williams, W.L. Wolfe; "Handbook of Optics, Volume I Fundamental, Techniques and Design", *McGRAW-HILL INC* (1995)
- [12] F. Träger; "Springer Handbook of Laser and Optics", *Springer* (2007)
- [13] Z. Bielecki, A. Rogalski; „Detekcja sygnałów optycznych”, *Wydawnictwa Naukowo Techniczne* (2001)
- [14] R.H. Lindsay, B.E. Paton; "Inexpensive photometer using light-emitting diodes", *American Journal of Physics* 44 (1976) 188-189
- [15] F.M. MIMS III; "Sun photoeter with light emitting diode as spectral selective detectors", *Applied Optics* 31 (1992) 6965-6967
- [16] R. Stojanovic, D. Karadaglic; "An optical sensing approach based on light emitting diodes", *Sensors and their Application, Journal of Physics: Conference Series* 76 (2007)

- [17] R. Stojanowic, D. Karadaglic; "A LED-LED based photophlethysmography sensor", *Physiological Measurement* 28 (2007) N19-N27
- [18] Haze Sun Photometer Atmospheric Network :<http://haze.concord.org/spworks.html>
- [19] Y. Ryu, D.B. Baldocchi, J. Verfaillie, S. Ma, M. Falk, I. Ruiz-Mercado, T. Hehn, O. Sonnentag; "Testing the performance of a novel spectral reflectance sensor, build with light emitting diodes (LEDs), to monitor ecosystem metabolism, structure and function", *Agricultural and Forest Meteorology* 150 (2010) 1597-1606
- [20] Y.B. Achary; "Spectral and emission characteristics of LED and its application to LED-based sun-photometry", *Optics & Laser Technology* 37 (2005) 547–550
- [21] E. Miyazaki, S. Itami, T. Araki; "Using a light-emitting diode as a high-speed, wavelength selective photodetector", *Review of Scientific Instruments* 69 (1998) 3751-3754
- [22] F.A.A. Matias, M.M.D.C. Vila, M. Tubino; "A simple device for quantitative colorimetric diffuse reflectance measurements", *Sensors and Actuators B* 88 (2003) 60-66
- [23] H. Zhu, S. Mavandadi, A.F. Coskun, O. Yaglidere, A. Ozcan; "Optofluidic Fluorescent Imaging Cytometry on a Cell Phone", *Analytical Chemistry* 83 (2011) 6641-6647
- [24] P.K. Dasgupta, I.Y. Eom, K.J. Morris, J. Li; "Light emitting diode- based detectors Absorbance, fluorescence and spectroelectrochemical measurements in planar flow- through cell", *Analytica Chimica Acta* 500 (2003) 337-364
- [25] K.M. Cantrell, J.D. Ingle; "The SLIM Spectrometer", *Analytical Chemistry* 75 (2003) 27-35
- [26] O. Elsholz, T.C. Rodrigues; "Vom LED-Photometer zum Photosensor", *GIT Labor-Fachzeitschrift* 6 (2005) 519-520
- [27] S. Jambunathan, P. K. Dasgupta, D.K. Wolcott, G. M. Marshall, D.C. Olson; "Optical fiber coupled light emitting diode based absorbance detector with a reflective flow cell", *Talanta* 50 (1999) 481-490
- [28] B. Yang, F. Tan, Y. Guan; "A collinear light-emitting diode-induced fluorescence detector for capillary electrophoresis", *Talanta* 65 (2005) 1303–1306
- [29] F. Huo, R. Guijt, D. Xiao, M.C. Breadmore; "Dual wavelength excitation fluorescence detector for capillary electrophoresis using a pulsed bi - colour light emitting diode," *Analyst* 136 (2011) 2234-2241

- [30] M.L. Chabynec, D.T. Chiu, J.C. McDonald, A.D. Stroock, J.F. Christian, A. M. Karger, G.M. Whitesides; "An Integrated Fluorescence Detection System in Poly(dimethylsiloxane) for Microfluidic Applications", *Analytical Chemistry* 73 (2001) 4491-4498
- [31] D. Meredith, G. Maidment, K. Gibbs; "Total ammonia monitoring using an optrode and an electrochemical sample pH adjusting system", *Water Science and Technology*, 37 (1998) 301-307
- [32] A. Dybko, W. Wróblewski, E. Rożniecka, K. Poźniak, J. Maciejewski, R. Romaniuk, Z. Brzózka; "Assessment of water quality based on multiparameter fiber optic probe", *Sensors and Actuators B* 51 (1998) 208-213
- [33] B. Müller, P.C. Hauser; "Fluorescence Optical Sensor for Low Concentrations of Dissolved Carbon Dioxide", *Analyst* 121 (1996) 339-343
- [34] N. Gros; "A new type of a spectrometric microtitration set up", *Talanta* 65 (2005) 907-912
- [35] H. Flaschka, C. McKeithan, R. Barnes; "Light Emitting Diodes and Phototransistor in Photometric Modules", *Analytical Letters* 6 (1973) 585-594
- [36] D. Betteridge, E.L. Dagless, B. Fields, N.F. Graves; "A Highly Sensitive Flow-through Phototransducer for Unsegmented Continuous-flow Analysis Demonstrating Highspeed Spectrophotometry at the Parts per 10⁹ Level and a New Method of Refractometric Determinations", *Analyst* 103 (1978) 897-908
- [37] D. Betteridge; "Flow Injection Analysis in the Teaching Laboratory", *Fresenius Zeitschrift für Analytical Chemistry* 312 (1982) 441-443
- [38] N. Gros; "A Novel Type of Tri- Colour Light- Emitting- Diode- Based Spectrometric Detector for Low- Budget Flow- Injection Analysis", *Sensors* 7 (2007) 166-184
- [39] C. Ugucione, A.A. Cardaso; "Flow Cell within a LED: a proposal for an optical absorption detector", *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 389 (2007) 1647-1650
- [40] M. Trojanowicz, W. Augustyniak, A. Hulanicki; "Photometric flow-injection measurements with flow-cell employing light emitting diodes", *Mikrochimica Acta* 83 (1984) 17-25

- [41] M. Trojanowicz, J. Szpunar-Łobińska, Z. Michalski; "Microcomponent Analysis with a Computerized Flow Injection System Using LED Photometric Detection", *Microchimica Acta* 103 (1991) 159-169
- [42] A. Morales - Rubio, B.F. Reis, M. de la Guardia; "Multicommutation in spectrometry", *Trends in Analytical Chemistry* 28 (2009) 903-913
- [43] B. Horstkotte, C.M. Duarte, V. Cerda; "A miniature and field applicable multipumping flow analyzer for ammonium monitoring in seawater with fluorescence detection", *Talanta* 85 (2011) 380-385
- [44] L. Ferrer, G. de Armas, M. Miro, J.M. Estela, V. Cerda; "A multisyringe flow injection method for the automated determination of sulfide in water using a miniaturized optical spectrophotometer", *Talanta* 64 (2004) 1119-1126
- [45] R.B. Ribeiro Mesquita, I.C. Santos, A.A. Bordalo, A.O.S. Silva Rangel; "Sequential injection system exploring the standard addition method for phosphate determination in high salinity samples: interstitial, transitional and coastal waters", *Analytical Methods* 4 (2012) 1452-1457
- [46] Q. Lu, G.E. Collins; "Microchip separations of transition metal ions via LED absorbance detection of their PAR complexes", *Analyst*, 126 (2001) 429-432
- [47] G.E. Collins, Q. Lu; "Radionuclide and metal ion detection on a capillary electrophoresis microchip using LED absorbance detection", *Sensors and Actuators B* 79 (2001) 244-249
- [48] S. Schmid, M. Macka, P.C. Hauser; "UV-absorbance detector for HPLC based on a light-emitting diode", *Analyst* 133 (2008) 465-469
- [49] J.R. Hamilton, J.S. White, M.B. Nakhleh; "Development of a low-cost four-color LED photometer", *Journal of Chemical Education* 73 (1996) 1052-1054
- [50] P.C. Hauser, T.W.T. Rupasinghe, N.E. Cates; "A multi-wavelength photometer based on light-emitting diodes", *Talanta* 42 (1995) 605-612
- [51] P.C. Hauser, T.W.T. Rupasinghe; "Simultaneous determination of metal ion concentrations in binary mixtures with a multi-LED photometer", *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* 357 (1999) 1056-1060
- [52] M.H. Sorouraddin, M. Saadati; "A simple fabrication of portable diffuse reflectometer for simultaneous analysis of common food dyes", *Sensors and Actuators B* 145 (2010) 367-372

- [53] N. Gros; "Spectrometer with microreaction chamber and tri-colour light emitting diode as a light source", *Talanta* 62 (2004) 143–150
- [54] T. Wigton, B.S. Chohan, C. McDonald, M. Johnson, D. Schunk, R. Kreuter, D. Sykes; "A Portable, Low-Cost, LED Fluorimeter for Middle School, High School and Undergraduate Chemistry Labs", *Journal of Chemical Education* 88 (2011) 1182-187
- [55] R.J. Berry, J.E. Harris, R.R. Williams; "Light-emitting diodes as sensors for colorimetric analyses", *Applied Spectroscopy* 51 (1997) 1521-1524
- [56] K.T. Lau, S. Baldwin, R.L. Shepherd, P.H. Dietz, W.S. Yerazunis, D. Diamond; "Novel fused-LEDs devices as optical sensors for colorimetric analysis", *Talanta* 63 (2004) 167-173
- [57] K.T. Lau, W.S. Yerazunis, R.L. Shepherd, D. Diamond; "Quantitative colorimetric analysis of dye mixtures using an optical photometer based on LED array", *Sensors and Actuators B* 114 (2006) 819–825
- [58] K.T. Lau, S. Baldwin, M. O'Toole, R. Shepherd, W.J. Yerazunis, S. Izuo, S. Ueyama, D. Diamond; "A low-cost optical sensing device based on paired emitter–detector light emitting diodes", *Analytica Chimica Acta* 557 (2006) 111–116
- [59] K.T. Lau, E. McHugh, S. Baldwin, D. Diamond; "Paired emitter-detector light emitting diodes for the measurement of lead(II) and cadmium(II)", *Analytica Chimica Acta* 569 (2006) 221–226
- [60] M. O'Toole, K.T. Lau, D. Diamond; "Photometric detection in flow analysis systems using integrated PEDDs", *Talanta* 66 (2005) 1340–1344
- [61] M. O'Toole, K.T. Lau, R. Shepherd, C. Slater, D. Diamond; "Determination of phosphate using a highly sensitive paired emitter-detector diode photometric flow detector", *Analytica Chimica Acta* 597 (2007) 290–294
- [62] M. O'Toole, K.T. Lau, B. Shazmann, R. Shepherd, P.N. Nesterenko, B. Paull D. Diamond; "Novel integrated paired emitter-detector diode (PEDD) as a miniaturized photometric detector in HPLC", *Analyst* 131 (2006) 938-943
- [63] L. Barron, P.N. Nesterenko, D. Diamond, M. O'Toole, K.T. Lau, B. Paull; "Low pressure ion chromatography with a low cost paired emitter–detector diode based detector for the determination of alkaline earth metals in water samples", *Analytica Chimica Acta* 577 (2006) 32–37

- [64] M. O'Toole, L. Barron, R. Shepherd, B. Paull, P.N. Nesterenko, D. Diamond; "Paired emitter-detector diode detection with dual wavelength monitoring for enhanced sensitivity to transition metals in ion chromatography with post- column reaction", *Analyst* 134 (2009) 124-130
- [65] R. Shepherd, W.S. Yerazunis, K.T. Lau, D. Diamond; "Low-Cost Surface Mount LED Gas Sensor", *IEEE Sensors Journal* 6 (2006) 861-866
- [66] R. Shepherd, S. Beirne, K.T. Lau, B. Corcoran, D. Diamond; "Monitoring chemical plumes in an environmental sensing chamber with a wireless chemical sensor network", *Sensors and Actuators B* 121 (2007) 142-149
- [67] C. Smyth, K.T. Lau, R. Shepherd, D. Diamond, Y. Wu, G. M. Spinks, G. G. Wallace; "Self- maintained colorimetric acid/base sensor using polypyrrole actuator", *Sensors and Actuators B* 129 (2008) 518-524
- [68] K.T. Lau, R. Shepherd, D. Diamond, D. Diamond; "Solid State pH Sensor Based on Light Emitting Diodes (LED) As Detector Platform", *IEEE Sensors Journal* 6 (2006) 848-859
- [69] Z. Marczenko; „Spektrofotometryczne oznaczanie pierwiastków”, *PWN* (1979)
- [70] J.E. O' Reilly; "Fluorescence Experiments with Quinine", *Journal of Chemical Education* 52 (1975) 610-612
- [71] G.S. Patterson; "A simplified Method for Finding the pKa of an Acid- Base Indicators by Spectrophotometry", *Journal of Chemical Education* 76 (1979) 395-398
- [72] W. Mizerski; „Tablice chemiczne”, *Adamantan* (1997)
- [73] R. Koncki, B. Rozum, S. Głąb; "pH-metric detection of alkaline phosphatase activity as a novel biosensing platform", *Talanta* 68 (2006) 1020-1025
- [74] W. Szczepaniak; „Metody instrumentalne w chemii analitycznej”, *PWN* (2004)
- [75] M.M. Bradford; "A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing Principle of Protein-Dye Binding", *Analytical Biochemistry* 72 (1976) 248-254
- [76] A.G. Gornall, C.J. Bardawill, M.M. David; "Determination of Serum Proteins by Means of the Biuret Reaction", *Journal of Biological Chemistry* 177 (1949) 751-766
- [77] O.H. Lowry, N.J. Rosenbrough, A.L. Farr, R.J. Randall; "Protein Measurements with the Folin Phenol Reagent", *Journal of Biological Chemistry* 193 (1951) 265-275

- [78] G. Veras, R.S. Honorato, V.T. Sarinho, M.C.U. Araujo; "A single solution for non- linear calibration in flow injection spectrophotometry. Kinetic determination of total protein in blood serum", *Analytica Chimica Acta* 401 (1999) 215-221
- [79] M.A. Oseas da Silva, M.A. Zezzi Arruda; "Mechanization of the Bradford reaction for the spectrophotometric determination of total protein", *Analytical Biochemistry* 351 (2006) 155-157
- [80] Ł. Tymecki, K. Strzelak, R. Koncki; "A single standard calibration module for flow analysis system based on solenoid microdevices", *Talanta* 79 (2009) 205-210
- [81] C. Blood, V.P. Studdert, C.C. Gay; "Saunders Comprehensive Veterinary Dictionary", *Elsevier* (2012)
- [82] H. Diehl, J.L. Ellingboe; "Indicator for titration of calcium in presence of magnesium using disodium dihydrogen ethylenediamine tetraacetate", *Analytical Chemistry* 28 (1956) 882-884
- [83] M.A. Demertzis; "Fluorimetric determination of calcium in serum with calcein. Complexation of calcein with calcium", *Analytica Chimica Acta* 209 (1988) 303-308
- [84] N. Chimpalee, D. Chimpalee, R. Jarungpattananon, S. Lawratchavee, D.T. Burns; "Spectrofluorometric flow- injection determination of calcium using Calcein", *Analytica Chimica Acta* 27 (1993) 247-251
- [85] A. Fonseca, J.M. Raimundo, J.J.R. Rohwedder, R.S. Lima, M.C.U. Araujo; "A microfluidic device with integrated fluorimetric detection for flow injection analysis", *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 396 (2010) 715-723
- [86] W.D. Sloan, M. Uttamlal; "A fibre- optic calcium ion sensor using a calcein derivative", *Luminescence* 16 (2001) 179-186
- [87] R. Belcher, C.L. Wilson; „Nowe metody w analizie chemicznej”, *PWN* (1958)
- [88] H.B. Wu; "Tietz Clinical Guide to Laboratory Test", *Elsevier* (2006)
- [89] S. Udenfriend, S. Stein, P. Böhlen, W. Dairman, W. Leimgruber, M. Weigle; "Fluorescamine: A Reagent for Assay of Amino Acids, Peptides, Proteins, and Primary Amines in the Picomole Range", *Science* 178 (1972) 871-872
- [90] T. Perez-Ruiz, C. Martinez-Lozano, V. Tomas, J. Fenoll; "Determination of protein in serum by fluorescence quenching of Rose Bengal using the stoped- flow mixing technique," *Analyst* 125 (2000) 507-510

- [91] W. Laiwattanapaisala, U. Kunanuvat, W. Intharachutia, C. Chinvongamornb, S. Hannongbuac, O. Chailapakuld; "Simple sequential injection analysis system for rapid determination of microalbuminuria", *Talanta* 79 (2009) 1104-1110
- [92] R. Koncki; "Chemical Sensors and Biosensors Based on Prussian Blue", *Critical Reviews in Analytical Chemistry* 32 (2002) 79-96
- [93] R. Koncki, O. S. Wolfbeis; "Optical Chemical sensing based on thin film of Prussian Blue", *Sensors and Actuators B* 51 (1998) 355-358
- [94] R. Koncki, O. S. Wolfbeis; "Composite Film of Prussian Blue and N- Substituted Polypyrroles: Fabrication and Application to Optical determination of pH", *Analytical Chemistry* 70 (1998) 2544-2550
- [95] "British Pharmacopoeia", *HM Stationery Office* (1988)
- [96] T. Lenarczuk, D. Wencel, S. Głąb, R. Koncki; "Prussian blue based optical glucose biosensor in flow injection analysis", *Analytica Chimica Acta* 447 (2001) 23-32
- [97] R. Koncki, O.S. Wolfbeis; "Composite Film of Prussian Blue and N-Substituted Polypyrroles: Covalent Immobilization of enzymes and application to near infrared optical biosensing", *Biosensors and Bioelectronics* 14 (1999) 87-92
- [98] Z. Gong, Z. Zhang; "An optosensor for riboflavin with C18 silica gel as substrate", *Analytica Chimica Acta* 339 (1997) 161-165
- [99] K. Su, Y.S. Chang, C.H. Lin; "Analysis of riboflavin in beer by capillary electrophoresis/blue light emitting diode (LED)-induced fluorescence detection combined with a dynamic pH junction technique", *Talanta* 64 (2004) 970-974
- [100] J. Lorent-Martinez, J.F. Garcia-Reyes, P. Ortega-Barrales, A. Molina-Diaz; "A multicommutated fluorescence-based sensing system for simultaneous determination of Vitamins B₂ and B₆", *Analytica Chimica Acta* 555 (2006) 128-133
- [101] M. O'Toole, R. Shepherd, G.G. Wallace, D. Diamond; "Inkjet printed LED based pH chemical sensor for gas sensing", *Analytica Chimica Acta* 652 (2009) 308-314
- [102] D. Orpen, S. Beirne, C. Fay, K. T. Lau, B. Corcoran, D. Diamond; "The optimization of a paired emitter- detector diode optical pH sensing device", *Sensors and Actuators B* 153 (2011) 182-187

- [103] M. Perez de Vargas-Sansalvador, C. Fay, T. Phelan, M.D. Fernandez-Ramos, L.F. Capitan-Vallvey, D. Diamond, F. Benito-Lopez; "A new light emitting diode- light emitting diode portable carbon dioxide gas sensor based on an interchangeable membrane system for industrial applications", *Analytica Chimica Acta* 699 (2011) 216-222
- [104] M. Perez de Vargas-Sansalvador, C. Fay, M.D. Fernandez-Ramos, D. Diamond, F. Benito-Lopez, L.F. Capitan-Vallvey, LED-LED portable oxygen gas sensor", *Analytical and Bioanalytical Chemistry* (2012) w druku
- [105] V. Lange, F. Lima, D. Kühlke; "Multicolour LED in luminescence sensing application", *Sensors and Actuators A* 169 (2011) 43-48
- [106] E. Mieczkowska, R. Koncki, Ł. Tymecki; "Hemoglobin determination with Paired emitter- detector diode", *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 399 (2011) 3293-3297
- [107] Ł. Tymecki, L. Brodacka, B. Rozum, R. Koncki; "UV- PEDD photometry dedicated for bioanalytical uses", *Analyst* 134 (2009) 1333-1337
- [108] K. Strzelak, R. Koncki, Ł. Tymecki; "Serum alkaline phosphatase assai with paired emitter detector diode", *Talanta* 96 (2012) 127-131
- [109] B. Rozum, K. Gajownik, Ł. Tymecki, R. Koncki; "Poly(vinyl chloride) tubing with covalently bound alkaline phosphatase and alternative approach for investigation of open- tubular bioreactors", *Analytical Biochemistry* 400 (2010) 151-153
- [110] S. Koronkiewicz, S. Kalinowski; "A novel direct-injection photometric detector integrated with solenoid pulse- pump flow system", *Talanta* 86 (2011) 436-441
- [111] S. Koronkiewicz, S. Kalinowski; "Application of direct- injection detector integrated with the multi- pumping flow system to photometric stop- flow determination of total iron", *Talanta* 96 (2012) 68-74
- [112] M.B. Da Silva, C.C, Crispino, B.F. Reis; "Automatic Photometric Titration Procedure Based on Multicomutation and Flow- Bath Approaches Employing a Photometer Based on Twin LED", *Journal of the Brazilian Chemical Society* 21 (2010) 1854-1860